



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

**Tesi di Laurea Magistrale in
Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali**

**Produzione sostenibile di microalghe: riciclo di nutrienti
mediante digestione anaerobica e Flash hydrolysis**

Relatore: Prof. Alberto Bertucco
Correlatore: Ing. Elena Barbera

Laureanda: SIMONA CAVALLARO

ANNO ACCADEMICO 2014 – 2015

Riassunto

In questa tesi è affrontato il problema del riciclo dei nutrienti (in particolare azoto e fosforo) in un processo di produzione di microalghe per ottenere biocarburanti, al fine di aumentarne la sostenibilità ambientale ed economica. Sono state investigate due diverse tecniche di riciclo: la digestione anaerobica della biomassa microalgale in seguito all'estrazione della frazione oleosa, e la *flash hydrolysis*. Entrambi i processi producono una fase acquosa contenente i nutrienti necessari alla crescita microalgale, che può essere riciclata. L'obiettivo principale è stato quello di verificare sperimentalmente in sistemi batch se la crescita microalgale è possibile in queste due fasi acquose. Nel caso della *flash hydrolysis*, è stato studiato anche un sistema di coltivazione in continuo alimentato dall'idrolizzato, considerando dapprima l'effetto della concentrazione di nutrienti nell'alimentazione, e in seguito del tempo di permanenza, sulla produttività. Si è posta attenzione sulla resa e sui consumi dei nutrienti alle varie condizioni sperimentali, al fine di ottimizzarne il quantitativo necessario per mantenere una produttività fissata.

Si è dimostrato che la crescita microalgale, per le specie considerate in questo studio, è possibile in entrambe le fasi acquose di riciclo, senza bisogno di preventivi trattamenti di sterilizzazione. Inoltre, seppur con determinate accortezze soprattutto per quanto concerne il digestato, essa è comparabile con la crescita che si ottiene in terreni di coltura classici. Dall'esperimento in continuo è stato possibile identificare le condizioni più adatte di concentrazione di idrolizzato per ottenere una produttività assunta, e il tempo di permanenza ottimale.

Sui risultati sperimentali del processo continuo sono stati verificati i bilanci di materia ed energia.

Indice

Riassunto

Introduzione

1

Capitolo 1: Biofuel da microalghe, nutrienti e il loro riciclo

4

1.1 Energia da microalghe: vantaggi

4

1.2 Produzione di biodiesel, estrazione e transesterificazione dei lipidi

5

1.3 Impedimenti alla commercializzazione

8

1.3.1 La disponibilità dell'anidride carbonica

8

1.3.2 La fornitura di azoto e fosforo

9

1.3.3 Costi di produzione e rapporto di energia

10

1.4. Le diverse forme possibili d'approvvigionamento dell'azoto

11

1.4.1. Azoto inorganico

12

1.4.1.1. Ossidi d'azoto.

12

1.4.1.2. L'ammoniaca / ammonio.

13

1.4.1.3. N₂ molecolare.

15

1.4.2. Azoto organico

15

1.5 Il fosforo nella coltura delle alghe

15

1.6 Potassio, zolfo e micronutrienti

16

1.7 Riciclo dei nutrienti per una produzione sostenibile delle microalghe

17

1.7.1 Digestione anaerobica integrata alla produzione di biofuel da microalghe

18

1.7.1.1 Problemi legati alla digestione anaerobica

20

1.7.1.2 Basse concentrazioni di substrato

20

1.7.1.3 Degradabilità delle celle e pretrattamenti

20

1.7.1.4 Rapporto tra carbonio e azoto, codigestione

21

1.7.2 Inibitori della digestione anaerobica

22

1.7.2.1 Tossicità dell'ammonio

22

1.7.2.2 Lo zolfo e il suo ruolo all'interno della digestione

22

1.7.2.3 Microalghe saline ed effetto della salinità

22

1.7.3 Crescita microalgale in un digestato: velocità di crescita e di produzione di biomassa

23

1.7.4 Processo hydrothermal

25

1.7.4.1 Hydrothermal gasification

26

1.7.4.2 Hydrothermal liquefaction

26

1.7.4.3 Hydrothermal carbonization

29

1.7.4.4 Flash Hydrolysis

32

1.8 Scopo della tesi	33
Capitolo 2: materiali e metodi	35
2.1 Specie algali e sistemi di crescita	35
2.2 Terreni di coltura utilizzati	36
2.3 Metodi analitici per misurare la crescita delle cellule	38
2.3.1 Conta cellulare, velocità di crescita	38
2.3.2 Densità ottica	39
2.3.3 Peso secco	40
2.4 Metodi analitici per misurare i nutrienti	41
2.4.1 Caratterizzazione del fosforo	41
2.4.2 Caratterizzazione dell'azoto	43
2.4.2.1 Azoto ammoniacale	43
2.4.2.2 Azoto totale	44
2.4.3 Caratterizzazione COD	45
Capitolo 3: digestione anaerobica :risultati	48
3.1 Curva di controllo	48
3.2 C. protothecoides cresciuta nel digestato	50
3.2.1 Crescita nel digestato	50
3.2.2 Crescita nel digestato con il giusto apporto di fosforo	52
3.2.3 Crescita nel digestato, effetto del PH	53
3.3 Crescita nel digestato con apporto di micronutrienti e analisi elementare del digestato	54
3.3.1. Crescita nel digestato con apporto di solo ferro	56
3.3.2 Crescita nel digestato con apporto di Fe,Zn,Cu	57
3.3.3 Crescita nel digestato con apporto di solfato di magnesio	58
3.4 Considerazioni conclusive	59
Capitolo 4: flash Hydrolysis: risultati	62
4.1 Esperimenti in Batch	62
4.1.1 Crescita in presenza di anidride carbonica	62
4.1.1.1 Illuminazione continua	62
4.1.1.2 Illuminazione alternata (12 ore)	64
4.1.2. Crescita in assenza di anidride carbonica	66
4.1.2.1 Illuminazione continua	66
4.1.2.2 Illuminazione alternata (12 ore)	68

4.3 Esperimenti in continuo	70
4.3.1 Effetto della concentrazione di idrolizzato in alimentazione	70
4.3.2 Effetto del tempo di permanenza	78
4.3.2 Bilanci di materia ed energia	84
Conclusioni	87
Bibliografia	90

Introduzione

La ricerca di energie alternative ai combustibili fossili è sempre più incoraggiata sia dal fatto che questi sono in esaurimento, sia in relazione all'enorme impatto ambientale causato dal loro impiego (produzione di gas serra). La produzione di biocarburanti da microalghe sta destando sempre maggiore interesse, ma ad oggi sono numerosi gli ostacoli ancora da superare per rendere tale processo economicamente attraente. Tra i più critici vi è quello dell'approvvigionamento dei nutrienti (principalmente azoto e fosforo) troppo dispendioso e ancora non sostenibile date le elevate quantità richieste per una produzione massiva di biocarburanti. Molti studi sono stati condotti sulla crescita microalgale utilizzando come substrato dei reflui provenienti da acque di scarico urbano, mentre si sono studiate meno altre acque di processo ricche di nutrienti. Il presente lavoro è incentrato sullo studio di tecniche di riciclo dei nutrienti direttamente dalla biomassa stessa, dal momento che essi non vengono inglobati nella frazione oleosa destinata alla produzione dei biocarburanti. L'obiettivo del lavoro è principalmente di verificare se la crescita microalgale è possibile nelle fasi acquose ottenute da due diversi trattamenti effettuati sulla biomassa prodotta, la digestione anaerobica dei solidi residui dopo l'estrazione degli oli e la *flash hydrolysis* della biomassa tal quale.

L'elaborato si compone di quattro capitoli. Nel primo capitolo è riassunto lo stato dell'arte sulla produzione di biocarburanti da biomassa microalgale, mettendo in evidenza i numerosi vantaggi legati all'uso di microalghe rispetto alle altre fonti di biodiesel, e i limiti alla commercializzazione, in particolare relativamente all'apporto dei nutrienti. Inoltre in questo capitolo sono presentate brevemente le diverse forme possibili di approvvigionamento di azoto, fosforo e carbonio, per concludere con lo stato dell'arte relativo alle tecniche di riciclo dei nutrienti stessi.

Nel secondo capitolo sono descritte le metodologie sperimentali utilizzate. In particolare sono presentate le specie algali considerate, e i rispettivi reattori utilizzati negli esperimenti, insieme alle metodologie analitiche impiegate per monitorare la crescita, e per misurare le concentrazioni dei vari nutrienti di interesse (azoto, fosforo, COD). Infine, vengono fornite le caratterizzazioni dei diversi terreni adottati per la crescita algale: terreno standard (BG11), digestato e idrolizzato.

I risultati relativi agli esperimenti di crescita effettuati usando come mezzo di coltura il digestato sono contenuti nel terzo capitolo. Vengono presentate le curve di crescita e le relative velocità, ottenute dapprima sul digestato tal quale, e approfondendo in seguito l'influenza di diversi parametri, quali il pH, e le concentrazioni di altri nutrienti minori (Fe, Zn, Cu, S).

Infine nell'ultimo capitolo sono esposti i risultati ottenuti utilizzando come terreno di coltura l'idrolizzato proveniente dalla *flash hydrolysis*. In prima analisi sono presentate le curve di crescita in batch, a diverse condizioni, dalle quali si sono determinate le potenzialità di coltivare su tale substrato. Nel secondo paragrafo sono discussi i risultati ottenuti utilizzando un sistema di coltivazione in continuo, nel quale è stata variata dapprima la concentrazione dell'idrolizzato in ingresso e in un secondo momento il tempo di permanenza della coltura nel reattore.

Capitolo 1

Biofuels da microalghe, nutrienti e il loro riciclo

In questo capitolo vengono sintetizzati i vantaggi legati all'utilizzo delle microalghe per produrre biodiesel. In particolare, si considerano i limiti della produzione concentrandosi maggiormente sulla disponibilità dei nutrienti necessari alla crescita algale, e sulle differenti forme di approvvigionamento di questi ultimi. Il capitolo termina con la descrizione delle diverse tecnologie disponibili per riciclare i nutrienti: digestione anaerobica e processi *hydrothermal*.

1.1 Energia dalle microalghe : vantaggi

Lo sviluppo della coscienza ambientale, che è andata maturando nelle ultime decadi del XX secolo, è stata incentivata dalla consapevolezza che le sorgenti di combustibili fossili sono in esaurimento ed ha spinto i diversi paesi a ricercare nuove fonti di energia rinnovabili e con un minore impatto ambientale. Fra le nuove tecnologie in via di sviluppo, la produzione di biocarburanti da biomassa è considerata una delle più promettenti per ridurre la dipendenza da combustibili fossili (Ho et al. 2014). In particolare, la produzione di biomassa da alghe ha destato grande interesse visti i numerosi vantaggi che offre. Le microalghe hanno infatti una velocità di crescita di circa 10-50 volte maggiore rispetto alle piante terrestri, che si riflette anche nel fissaggio di una maggiore quantità di anidride carbonica (Lam & Lee, 2012). Inoltre non necessitano di suoli di particolare qualità, riducendo notevolmente la competizione con i terreni coltivabili. Per alcune specie algali si può utilizzare acqua di mare, senza dunque dover consumare acqua dolce.

Come fonte di carbonio inorganico si può utilizzare la CO₂ presente nei gas di scarico industriali, riducendo contemporaneamente le emissioni di gas serra di una azienda o di un processo (bio-fissazione). Inoltre le microalghe possono essere utilizzate per il trattamento delle acque di scarico con lo scopo di rimuovere NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ e metalli pesanti che esse sfruttano invece per la loro crescita (Abdel-Raouf et al. 2012).

Infine, il contenuto di olio nelle microalghe è mediamente più elevato rispetto alle altre piante utilizzate per la produzione di biocarburanti di prima e seconda generazione (Martins et al., 2010).

Dopo l'estrazione dei lipidi la biomassa rimanente può essere trasformata in etanolo, metano (biogas), oppure essere utilizzata per l'alimentazione del bestiame o come fertilizzante organico grazie al suo elevato rapporto N/P. In alternativa può essere semplicemente bruciata per la cogenerazione di energia (elettricità e calore) o recuperata e riciclata per un'ulteriore coltivazione algale. La grande varietà di specie microalgali presenti in natura consente di selezionare quella più adatta ai diversi utilizzi e al sito di produzione.

1.2 Produzione del biodiesel: estrazione e trans esterificazione dei lipidi

Il contenuto lipidico nelle alghe varia molto a secondo della specie considerata e del processo di produzione. Al fine di ottenere biocarburanti, l'attenzione si concentra sulle specie in grado di accumularne maggiori quantità. Le microalghe sintetizzano diverse molecole lipidiche, che si trovano custodite in molecole organiche complesse e hanno un ruolo di riserva di energia metabolica e di *signaling* intracellulare (Maity 2014). Da un punto di vista applicativo vi sono alcuni lipidi particolarmente interessanti come ad esempio i triacilgliceroli (TAG), che possono essere trasformati direttamente in biodiesel per transesterificazione. Una selezione accurata della specie algale è fondamentale ai fini dello sviluppo industriale. In tabella 1.1 sono riportate le principali specie microalgali utilizzate, con la corrispondente percentuale lipidica su biomassa essiccata e la produttività lipidica in $\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Maity et al. 2014)

Tabella 1.1. Specie microalgali maggiormente utilizzate, con la corrispondente percentuale lipidica su biomassa essiccata e la produttività lipidica (Maity et al. 2014)

Microalgae species	Alga type	Lipid content (% dry weight biomass)/Oil content	Lipid productivity (mg/L/day)
<i>Arthrospira maxima</i>	Blue green	20.34	—
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	Green	24.0–31.0	—
<i>Botryococcus braunii</i>	Green	25.0–75.0	—
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Diatom	33.6	21.8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Diatom	14.6–16.4/39.8	17.5
<i>Chlorella emersonii</i>	Green	25.0–63.0	10.3–50.0
<i>Chlorella minutissima</i>	Green	57	—
<i>Chlorella protothecoides</i>	Green	14.6–57.8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Green	19.0–22.0	44.7
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11b	Green	19.2	170
<i>Chlorella vulgaris</i>	Green	5.0–58.0	11.2–40.0
<i>Chlorella</i> sp.	Green	10.0–48.0	42.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Green	11–26	—
<i>Chlorella</i> sp.	Green	18.0–57.0	18.7
<i>Chlorococcum</i> sp. UMACC 112	Green	19.3	53.7
<i>Cylindrotheca</i> sp.	Diatom	16–37	—
<i>Cryptocodinium colnii</i>	Red	20.0–51.1	—
<i>Dunaliella salina</i>	Green	16–44	46
<i>Dunaliella primolecta</i>	Green	23	—
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Green	16.7–71.0	—
<i>Ellipsoidion</i> sp.	Eustigmatophytes	27.4	47.3
<i>Euglena gracilis</i>	Green	14.0–20.0	—
<i>Haematococcus pluvialis</i>	blood-red	15.61–32.99	—
<i>Isochrysis galbana</i>	Prymnesiophytes	7.0–40.0	—
<i>Isochrysis</i> sp.	Prymnesiophytes	7.1–33	37.8
<i>Monodus subterraneus</i> UTEX 151	Eustigmatophytes	16.1	30.4
<i>Monallanthus salina</i>	Green	20.0–22.0	—
<i>Nannochloris</i> sp.	Green	20.0–56.0	60.9–76.5
<i>Nannochloropsis oculata</i> NCTU-3	Green	30.8–50.4	142
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Green	22.7–29.7	84.0–142.0
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Eustigmatophytes	12.0–68.0	37.5–90.0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Green	29.0–65.0	90.0–134.0
<i>Nitzschia</i> sp.	Diatom	16.0–47.0	—
<i>Oocystis pusilla</i>	Green	10.5	—
<i>Pavlova salina</i>	Prymnesiophytes	30.9	49.4
<i>Pavlova lutheri</i>	Prymnesiophytes	35.5	40.2
<i>Phaeodactylum tricorneratum</i>	Diatoms	18.0–57.0	44.8
<i>Porphyridium cruentum</i>	Red	9.0–18.8/60.7	34.8
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Green	6–7/16–40	—
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Green	11–22/35–55	—
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Green	1.9–18.4	35.1
<i>Schizochytrium</i> sp.	yellow-green	50–57	—
<i>Scenedesmus</i> sp. DM	Green	19.6–21.1	40.8–53.9
<i>Skeletonema</i> sp.	Diatoms	13.3–31.8	27.3
<i>Skeletonema costatum</i>	Diatoms	13.5–51.3	17.4
<i>Spirulina platensis</i>	Green	10.30 ± 0.10	—
<i>Spirulina maxima</i>	Green	4.0–9.0	—
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Diatoms	20.6	17.4

I lipidi possono essere estratti dalla biomassa algale, generalmente essiccata in precedenza, utilizzando metodi di natura fisica o chimica. Il metodo più comunemente utilizzato è l'estrazione con miscela di solventi organici. Altre tecniche comprendono metodi elettromagnetici, liquefazione diretta (che non richiede la fase di essiccazione), fluidi supercritici (CO₂), onde ultrasoniche (Halim et al., 2012). La frazione oleosa estratta è composta principalmente da trigliceridi (per il 90-98% in peso) e da mono e digliceridi in piccole quantità (1-5%): si ritrovano inoltre tracce di fosfolipidi, fosfatidi, caroteni, tocoferoli, composti di zolfo e tracce di acqua (Martins 2010). Una volta estratti i lipidi vengono fatti reagire con alcoli e tramite transesterificazione si giunge alla produzione di biodiesel. La reazione di transesterificazione si sviluppa in più fasi, in cui i trigliceridi vengono fatti reagire con alcoli a catena corta (ad esempio metanolo o etanolo) in presenza di catalizzatore: il prodotto ottenuto è dunque l'estere dell'alcol utilizzato come reagente, mentre come sottoprodotto

si ha il glicerolo. La reazione è catalizzata in genere da composti basici come ad esempio KOH e NaOH. In figura 1.1 è riportata una rappresentazione della reazione globale di transesterificazione

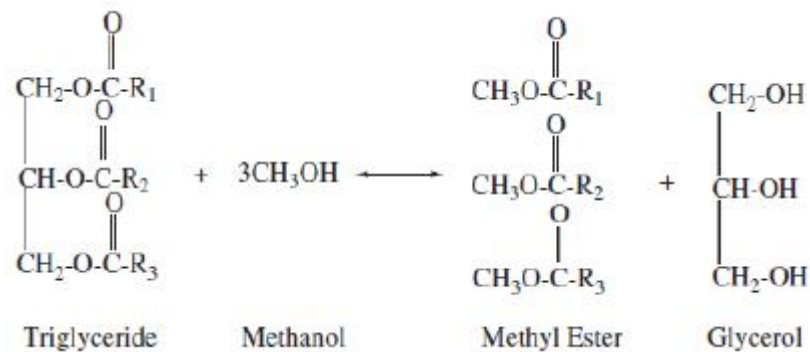


Figura 1.1 – transesterificazione dei trigliceridi (reazione globale) (Lam & Lee, 2012).

Il processo di estrazione dei lipidi seguita da transesterificazione rappresenta il metodo convenzionale per produrre biodiesel. L'alternativa è integrare le due fasi in un unico passaggio scegliendo un opportuno solvente che estragga i lipidi e in seguito li converta in biodiesel. La transesterificazione in-situ offre diversi vantaggi rispetto ai tradizionali metodi di produzione di biodiesel, tra cui: minimizzare le unità operative e la strumentazione, ridurre i tempi di lavorazione, con la conseguenza comune di ridurre il costo complessivo di produzione (Rawat et al., 2013). L'estrazione dei lipidi da biomassa microalgale rappresenta ancora uno dei tanti colli di bottiglia che ostacolano la produzione su scala industriale di biodiesel da microalghe (Halim et al., 2011). Ciascuna delle tecnologie attuali ha infatti, i suoi vantaggi e suoi limiti. L'estrazione con solvente ha il vantaggio di non reagire con i lipidi e in alcuni casi può essere efficace anche se si lavora con un'alimentazione umida (senza necessità dunque del costoso passaggio di essiccazione). Per contro è un metodo lento e poco sostenibile sia dal punto di vista economico che ambientale in quanto prevede l'uso di una grande quantità di solventi che spesso sono costosi e tossici. D'altra parte, l'estrazione con anidride carbonica supercritica è una tecnologia verde (non tossica) e promettente ma costosa. Infatti a fronte di vantaggi come alta selettività, tempi brevi richiesti per l'estrazione, non tossicità, vi sono anche svantaggi principalmente associati all'elevato costo di capitale e all'elevata richiesta d'energia per la compressione del fluido supercritico.

1.3 Impedimenti alla commercializzazione

Nonostante i numerosi vantaggi descritti nei paragrafi precedenti, ad oggi non esistono ancora impianti per la produzione di biodiesel da microalghe operanti su scala industriale. Ciò è dovuto a una serie di limiti, riassunti brevemente di seguito.

1.3.1 La disponibilità di anidride carbonica

L'anidride carbonica è essenziale alla crescita delle microalghe. Per ogni tonnellata di biomassa prodotta occorrono 1,83 t di CO₂ (Chisti, 2007). Il carbonio contribuisce alla formazione di tutti i composti organici, ed è il principale elemento presente nelle microalghe, arrivando fino al 65% del peso secco, anche se il contenuto varia significativamente a seconda della specie. Su scala pilota si è osservato che il costo dell'anidride carbonica è responsabile di circa il 50% dei costi di produzione di biomassa. Ciò porta alla conclusione che la produzione di alghe non è sostenibile se l'anidride carbonica non è disponibile gratuitamente. Potenzialmente si potrebbero sfruttare i fumi di scarico delle centrali elettriche a carbone o delle industrie di cemento: entrambe rappresentano infatti due fonti concentrate importanti di diossido di carbonio. Se per esempio si riuscisse a convertire in carbonio il 10% della CO₂ emessa dalle centrali elettriche presenti negli Stati Uniti (1.5 bilioni di tonnellate nel 2012), si produrrebbero annualmente 82 milioni di tonnellate di biomassa, che equivalgono a 31 milioni di tonnellate di olio combustibile, comparabili a 27'982 milioni di litri di petrolio prodotti annualmente (in termini energetici, 1L di petrolio equivale a 1,25 L di olio combustibile algale, Chisti, 2012). Adottando soluzioni di questo tipo si entrerebbe però in un circolo vizioso che rende indispensabile l'uso della combustione del carbone o di altri combustibili fossili. L'ideale sarebbe riuscire a sfruttare l'anidride carbonica presente in atmosfera, circa 0,039% in volume: oltre al grande vantaggio economico si ridurrebbe notevolmente il *carbon footprint* dell'intero processo di produzione di olio combustibile algale. Nei sistemi di coltivazione aperti, la CO₂ è spesso trasferita passivamente dall'atmosfera al mezzo di coltura ma poiché l'area di contatto specifica e il gradiente di concentrazione sono bassi (a causa della bassa concentrazione di CO₂ nell'atmosfera) il mass transfer di CO₂ verso la soluzione è spesso troppo basso per garantire un'alta velocità di crescita accettabile. Sfortunatamente non è possibile ottenere un'elevata produttività di biomassa algale sfruttando la sola anidride carbonica disponibile alla concentrazione atmosferica, poiché l'assorbimento nel mezzo di coltura è molto lento rispetto alla velocità di crescita. Dunque occorre applicare delle tecnologie di tipo fisico-chimico per catturare e concentrare il biossido di carbonio presente naturalmente nell'atmosfera. Quelle attualmente disponibili risultano però ancora troppo costose. Per le specie algali che possono essere coltivate in condizioni fortemente alcaline, il carbonio inorganico può essere in alternativa fornito sotto forma di bicarbonato. Tale metodo di

somministrazione del carbonio tuttavia non può essere applicato per la coltivazione di alghe marine, infatti per valori di pH superiori ad 8 i sali marini tendono a precipitare (Chisti 2013). L'insufficienza di fonti concentrate di biossido di carbonio può suggerire l'uso di carbonio organico: la crescita eterotrofa raggiunge una produttività estremamente elevata di biomassa e combustibile, rispetto a quella ottenuta sfruttando carbonio inorganico e luce solare per la crescita (Chisti 2013). Le microalghe sono microrganismi autotrofi, ma alcune specie sono in grado di crescere sfruttando le molecole organiche (per via eterotrofa o mixotrofa). Solo alcune specie possono però assimilare una specifica molecola organica (Chisti 2013). Le molecole organiche più utilizzate e conosciute sono: monosaccaridi (come il glucosio, fruttosio ecc), acidi grassi volatili (come acido acetico), glicerolo e urea (Chisti 2013). Tuttavia la produzione di un terreno di coltura eterotrofo necessita a sua volta di fissare nuovamente del carbonio per via fotosintetica (biomassa, scarti alimentari) e secondariamente di una serie di unità operative che funzionano grazie all'uso di combustibili fossili. Una modalità di crescita che combina la fotosintesi e l'eterotrofia, ovvero la mixotrofia, ha un potenziale limitato come cultura fotosintetica su larga scala, poiché la contaminazione di batteri che crescono inevitabilmente su carbonio organico ne riducono pertanto la produttività (Chisti 2013).

1.3.2 La fornitura di azoto e fosforo

Oltre al biossido di carbonio, la crescita algale richiede azoto (N) e fosforo (P) come fonti nutritive. La disponibilità di fosforo in natura è limitata in quanto esso è presente solo nei minerali rocciosi. Per quanto riguarda l'azoto come fertilizzante, invece esso può essere prodotto a piacere, ma richiede l'impiego di energia fossile. Il fissaggio di azoto atmosferico attraverso il processo Haber-Bosch (classico), richiede una quantità enorme di energia. Si pensi che quasi l'1.2% del consumo globale di energia è destinato alla produzione di azoto come fertilizzante. Allo stato attuale i metodi di produzione e la disponibilità di fertilizzanti di N e P destinati all'agricoltura, sarebbero del tutto insufficienti per una produzione significativa di oli da biomassa algale. Infatti per produrre 82 milioni di tonnellate di biomassa algale sono richieste 5.4 milioni di tonnellate di N, (quasi il 44% dell'attuale impiego globale) e 1.1 milioni di tonnellate di fosforo (Chisti 2013). Queste grandi quantità richieste entrano in competizione con la fornitura di fertilizzanti ad uso agricolo.

Poiché ridurre le emissioni di carbonio e l'uso di combustibili fossili rientra nel grande progetto di produzione di biocarburanti, la richiesta di un grosso quantitativo di fertilizzanti attraverso le tecnologie convenzionali nella coltivazione delle alghe può essere controproducente. Tutto questo suggerisce che N e P debbano essere recuperati il più possibile dalla biomassa algale una volta

estratti i lipidi. Poiché questi contengono relativamente poca quantità di N e P, la maggior parte dei nutrienti rimane nella biomassa esausta, altrimenti inutilizzata. Il riciclo dei nutrienti è essenziale per la sostenibilità della produzione di combustibili algali. A tal proposito esistono diverse idee di processo che oltre a produrre biofuels producono come sottoprodotto una fase acquosa ricca in nutrienti, potenzialmente utilizzabile sempre all'interno dello stesso processo come alimentazione ai fotobioreattori per la crescita algale. Questo argomento verrà approfondito nei prossimi paragrafi.

Un'alternativa al riciclo di azoto può essere l'ausilio di cianobatteri e altri batteri, i quali fissano biologicamente l'azoto atmosferico rendendolo disponibile come fonte per la coltura delle alghe (Chisti 2013). Il fissaggio dell'azoto tuttavia è estremamente sensibile all'inattivazione da ossigeno e potrebbe quindi risultare incompatibile con i processi foto sintetici. Tuttavia tramite ingegneria metabolica tale accoppiamento è stato reso possibile. Inoltre si possono modificare gli enzimi nitrogenasi per essere più resistenti all'inattivazione da ossigeno. In aggiunta a tutte queste considerazioni ogni grande metropoli genera una notevole quantità di acque reflue domestiche, che contenenti un'alta quantità di N e P, utilizzabili come nutrienti per la produzione di alghe. Sfortunatamente però tale metodo non ha alte produttività. Nel migliore dei casi, l'olio algale da acque reflue può contribuire al massimo all'1% della domanda di petrolio di una grande città degli Stati Uniti (Chisti 2013).

1.3.3. Costi di produzione e rapporti di energia

Il prezzo del petrolio oscilla notevolmente nel tempo e rispecchia poco il costo effettivo della sua produzione, e questa fluttuazione genera uno scenario d'investimento incerto per i biocarburanti, compresi i combustibili algali. Secondo quanto riportato da Chisti (2013), la concentrazione della biomassa algale da una corrente acquosa piuttosto diluita, e la successiva estrazione dei lipidi non sono i principali ostacoli alla commercializzazione, sebbene il loro notevole costo gravi sull'intero processo e si auspichino pertanto delle tecnologie più favorevoli. La maggiore difficoltà è in realtà legata alla produzione di una grande quantità di biomassa ad un costo sufficientemente basso. Le stime suggeriscono che una biomassa algale con un tenore di olio pari al 40% in peso dovrebbe essere prodotta ad un costo non superiore a 0,25 \$/kg (Chisti, 2012), se lo scopo è di far sì che l'olio algale divenga competitivo con il petrolio. Il vero costo dei combustibili fossili è nel loro impatto ambientale a lungo termine ma questo non viene ancora computato. Per concludere il costo effettivo della produzione della biomassa attualmente sembra essere almeno 10 volte maggiore a quella del petrolio. Secondo una stima (Norskeret 2011), in condizioni di produzione ottimizzate, il costo può essere ridotto al massimo a 0,68 \$/kg ma questo risulta tuttavia quasi 3 volte maggiore di quanto

richiesto. Tutte le tecnologie di produzione commerciale di biomassa algale per la produzione di oli esistenti risultano ad oggi piuttosto costose. Una stima recente suggerisce un costo finale di produzione di biodiesel nell'intervallo di 0,42-0,97 \$ per litro (Nagarajan et al., 2013); essa risulta basata su un circuito di vasche la cui produttività è stata assunta maggiore di $30\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$, e il recupero di olio pari al 50% in peso della biomassa.

Le tecnologie di concentrazione della biomassa e recupero dei lipidi stanno sono in continuo avanzamento (Chisti, 2012). Metodi di flocculazione-sedimentazione per concentrare a buon mercato la biomassa in un impasto denso esistono già e vengono via via migliorati. Per le ulteriori concentrazioni, in uno studio su scala pilota i filtri a nastro continuo, simili a quelli adottati nella concentrazione dei fanghi in alcuni processi di trattamento delle acque reflue, si sono dimostrati più economici dal punto di vista energetico in confronto a metodi di centrifugazione. L'estrazione con solvente, come precisato precedentemente, è al momento il metodo convenzionale per recuperare l'olio dalla biomassa, e può essere esteso su larga scala. Tuttavia, vi è la necessità di eliminare completamente l'uso di solventi petroliferi dal processo di recupero dell'olio algale.

In più la produzione di biocarburanti algali richiede energia di origine fossile per miscelare e pompare la cultura algale, filtrare la biomassa dall'acqua e per estrarne l'olio. Il carburante algale prodotto ha un buon contenuto energetico. Il "rapporto di energia" è definito come il rapporto tra l'energia contenuta nell'olio algale e quella fossile fornita per le diverse operazioni di produzione. Esso è un indice importante, che determina se la produzione di olio è conveniente. Idealmente, è da preferire un rapporto di energia ben superiore all'unità, almeno pari a 7 (Chisti 2013). È naturale pensare che l'ottimizzazione di tutti i vari passaggi sopra descritti ridurrebbe al minimo l'apporto di energia fossile ma un miglioramento sensibile lo si avrebbe soltanto con il recupero di nutrienti e il loro riciclo. In letteratura si trovano diversi valori di questi "rapporti di energia": quello di 1.4 è stato stimato per il diesel algale da Liu et al., (2012) ma generalmente si riscontrano valori inferiori all'unità (Khoo et al., 2011). Va precisato che molte di queste stime si basano su ipotesi poco realistiche, come considerare l'essiccazione prima dell'estrazione o prendere in considerazione solo tecnologie tradizionali molto costose.

1.4. Le diverse forme di' approvvigionamento dell' azoto

L'azoto è il secondo elemento più abbondante nella biomassa microalgale, con un contenuto che varia da 1% fino al 14% frequentemente tra il 5 e 10 % del peso secco (Markou 2014). L'azoto fa parte di composti biochimici essenziali per la crescita della biomassa, come gli acidi nucleici

(DNA, RNA), amminoacidi (proteine) e pigmenti. Esso viene assunto principalmente in forma inorganica (NO_3^- , NO_2^- , NO , NH_4^+) e in alcuni casi come N_2 , ma anche, in altri casi in forma organica, sotto forma di urea o amminoacidi semplici (Markou 2014). Le microalghe hanno un elevato contenuto di proteine (30 e 60%) rispetto alle piante terrestri e pertanto necessitano di quantità elevate di azoto. La presenza contemporanea di diverse forme di azoto nel mezzo di coltura influenza l'assorbimento di questo elemento da parte delle cellule. Quando è presente azoto ammoniacale, l'assorbimento di nitriti e nitrati risulta contenuto: le cellule rimuovono preferenzialmente prima tutta l'ammoniaca / ammonio e solo in seguito le altre forme presenti (Markou 2014). L'ammonio infatti inibisce il trasporto attivo di nitriti e nitrati nelle cellule, e la sintesi di nitrato e nitrito reduttasi (Markou 2014). D'altra parte, una concentrazione elevata di nitrato inibisce anche l'assorbimento di azoto ammoniacale (Markou 2014). Ammonio / ammoniaca reprimono anche l'assorbimento dell'urea, ma la concentrazione alla quale questo effetto si verifica sembra differire tra le specie (Markou 2014). Analogamente, nitrati e nitriti si inibiscono reciprocamente. Le microalghe preferiscono assumere la forma più ridotta di azoto. L'ordine di preferenza per l'apporto di azoto è $\text{NH}_4^+ > \text{NO} > \text{NO}_2^- > \text{NO}_3^- > \text{urea}$ (Markou 2014.). Di seguito, le varie forme di azoto assimilabili dalle microalghe sono riassunte in maniera più dettagliata.

1.4.1. Azoto inorganico

1.4.1.1. Ossidi d'azoto.

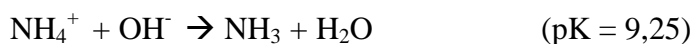
La forma di azoto minerale più comunemente usata per la coltivazione di microalghe e ciano batteri è il nitrato (NO_3^-). I sali nitrati più usati sono NaNO_3 e, meno frequentemente il nitrato di potassio (Markou 2014). Il nitrato non mostra effetti tossici per le cellule, dato che le microalghe possono tollerare concentrazioni fino a 100 mM di nitrati (Markou 2014). Tuttavia, è stato osservato che la crescita è influenzata negativamente quando si raggiungono concentrazioni particolarmente elevate. Si ipotizza che l'attività della nitrato -riduttasi aumenti quando le concentrazioni di nitrato sono elevate causando un'alta concentrazione intracellulare di nitrito e di ammonio, entrambi tossici per le cellule.

L'ossido nitrico (NO) può essere considerato come una forma d'azoto interessante, soprattutto quando si utilizzano gas di combustione. Esso ha tuttavia una bassissima solubilità nel mezzo di coltura, e questo diviene il fattore limitante per un suo impiego come fonte nutrizionale. Per migliorare la solubilità di NO , si può aggiungere EDTA (ossia dei complessanti a base di ferro) al mezzo di coltura (Markou 2014) oppure aumentare il tempo di ritenzione della bolla (NO), o in alternativa ridurre le dimensioni delle bolle stesse. L'Ossido di azoto disciolto può però essere

ossidato a nitrito o nitrato in presenza di ossigeno disciolto, ed entrambe le forme possono essere usate dalle microalghe per la loro crescita (Markou 2014). Tuttavia, a causa del fatto che l'ossido nitrico ha un piccolo ingombro sterico ed è un composto non polare, esso diffonde direttamente nelle cellule e viene ossidato a nitriti / nitrati a livello intercellulare. Il grado di NO tollerato dalle microalghe è specie-dipendente (Markou 2014). La forma NO₂ (nitriti) si trova frequentemente in ambienti naturali come prodotto intermedio del processo di nitrificazione, ovvero l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrato. La principale via di assorbimento del nitrito è attraverso il trasporto attivo, ma pure la diffusione è stata verificata anche per microalghe verdi e cianobatteri (Markou 2014). Sebbene il nitrito possa essere utilizzato come fonte di azoto, ad alte concentrazioni ha effetti tossici (Markou 2014). Yang ed altri. (citati nel Markou 2014) hanno osservato che una concentrazione di nitriti di 4 mM estende di 10 giorni la fase di latenza nelle colture di *Botryococcus braunii*, mentre nelle crescita delle microalghe un aumento di nitriti ad 8 mM ne causa una totale inibizione. In altri studi è stato approfondito di come la concentrazione di CO₂ influenzi l'assorbimento di nitriti, nel senso che a concentrazioni di CO₂ molto basse esso viene inibito, mentre una concentrazione elevata sembra incidere positivamente sull'attività della nitrito-riduttasi, aumentando l'assimilazione del nitrito (Markou 2014)

1.4.1.2. L'ammoniaca / ammonio.

L'ammoniaca è una molecola volatile ma a differenza della CO₂, la sua solubilità in acqua è molto elevata (circa il 35% in peso a 25° C) e si trova spesso come una soluzione liquida. Quando l'ammoniaca viene disciolta in acqua, reagisce con quest'ultima per formare un sistema tampone di ammoniaca / ammonio: (Markou 2014):



L'equilibrio tra le forme di ammonio (forma ionica) e ammoniaca libera (forma gassosa non ionizzata) dipende principalmente dal pH, come si può osservare in figura 1.2 a sinistra. A destra della stessa figura è riportato il rapporto percentuale, tra concentrazione di FA (free ammonia o ammoniaca libera) e TA (total ammonia) in funzione del pH parametrizzato e della temperatura.

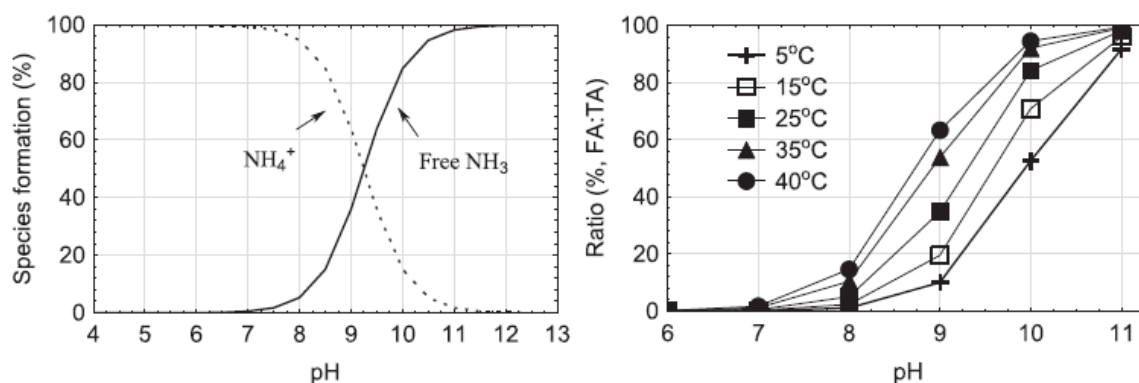


Figura 1.2 *Equilibrio fra le forme di ammonio (ionizzato) e ammoniaca libera (forma gassosa non ionizzata) in funzione del pH (a sinistra). Il rapporto, in percentuale, tra concentrazione di FA (free ammonia o ammoniaca libera) e TA (total ammonia) in funzione del pH e parametrizzato in funzione della temperatura. (Markou 2014)*

Per pH superiori a 9.25 la specie dominante è l'ammoniaca libera (NH₃). Anche la temperatura ha un effetto significativo sull'equilibrio tra le specie ammoniacale/ammonio; i valori di pK diminuiscono con l'aumentare della temperatura, il che significa che l'ammoniaca libera inizia ad essere dominante a valori di pH più bassi quando la temperatura è elevata. L'ammonio è la fonte di azoto preferito per le microalghe e cianobatteri perché il suo assorbimento e assimilazione consumano meno energia rispetto alle altre (Markou 2014).

Tuttavia, la produzione di biomassa microalgale e la velocità di crescita nel caso in cui si utilizzino ammoniacale/ammonio come fonte di azoto sono simili, o addirittura inferiori a quando si impiega il nitrato (Markou 2014). Un vincolo importante per l'azoto ammoniacale è la potenziale tossicità: L'ammoniaca libera ha infatti un effetto negativo sulle microalghe in concentrazioni relativamente basse (2 mM) (Markou 2014). Il fattore principale per controllare la tossicità è il pH del mezzo di coltura, che sposta l'equilibrio. La tossicità dell'ammoniaca dovrebbe essere presa in considerazione quando vengono utilizzati come mezzo di coltura acque reflue ricche in ammoniacale. Per evitare l'effetto negativo dell'ammoniaca libera, una strategia consiste appunto nel regolare i valori di pH al fine di limitare la concentrazione di questa (Markou 2014), oppure si può diluire il refluo per evitare di raggiungere una concentrazione di ammoniacale inibente (Markou 2014). Un'altra soluzione ancora è l'impiego di una modalità di coltura fed-batch, in cui l'ammoniaca viene aggiunta gradualmente al mezzo di coltura (Markou 2014).

Se l'ammonio viene utilizzato come fonte di azoto, il pH può diminuire durante l'assimilazione a causa del rilascio di H⁺ (al contrario, aumenta quando viene utilizzato il nitrato a causa del rilascio di OH⁻) (Markou 2014). Un ulteriore fattore da considerare quando si usa ammonio è che esso può

essere perso dal mezzo di coltura per volatilizzazione, soprattutto ad elevati valori di pH (Markou 2014).

1.4.1.3. N₂ molecolare

Alcuni cianobatteri e alcune diatomee sono in grado di assimilare come unica fonte di azoto il diazoto (N₂): per mezzo di un complesso enzimatico l'azoto molecolare viene ridotto a NH₄⁺. Tuttavia, tale via di approvvigionamento è molto dispendiosa dal punto di vista energetico, e per questo motivo ha una velocità di reazione molto bassa e non è ritenuto adatto per la produzione su larga scala (Markou 2014).

1.4.2 Azoto organico

Alcune specie microalgali sono in grado di assimilare azoto da forme organiche quali l'urea, e di altri aminoacidi. Questi sono trasportati attivamente nelle cellule e vengono metabolizzati a livello intracellulare (Markou 2014.). La principale forma di azoto organico utilizzabile per la coltivazione di microalghe è l'urea. Generalmente, essa viene idrolizzata tramite un enzima in ammoniaca e acido carbonico, che possono essere utilizzati entrambi dalle microalghe. Molti ricercatori hanno constatato che l'urea ha un'influenza positiva sulla crescita di alcune specie, come ad esempio *A. platensis*, *Chlorella* sp. o *Coccomyxa acidophila* (Markou 2014), le cui velocità di crescita sono risultate pari o addirittura superiori rispetto a colture che utilizzano altre fonti di azoto. Oltre all'urea, alcune microalghe sono anche in grado di utilizzare l'azoto contenuto negli aminoacidi, dimostrando di riuscire a crescere sia in modalità autotrofa che eterotrofa. Tuttavia la capacità delle microalghe di crescere utilizzando come fonte di azoto gli aminoacidi è specie dipendente e le velocità di crescita variano significativamente in funzione delle specie microalgali e dell'amminoacido utilizzato (Markou 2014).

1.5 Il fosforo nella coltura delle alghe

Il fosforo è uno dei nutrienti più importanti per la crescita di microalghe e il suo contenuto nella biomassa varia da 0,05% fino a 3,3% (Markou 2014). È presente in diverse molecole organiche essenziali per il metabolismo, come gli acidi nucleici (DNA e RNA), fosfolipidi di membrana e l'ATP (Markou 2014). Come anticipato nel §1.3.2, il fosforo è un elemento di origine fossile, non rinnovabile, e le sue riserve sono destinate ad esaurirsi (Markou 2014). Ci sono vari tipi di fertilizzanti a base di fosforo che possono essere utilizzati per la coltivazione di microalghe, quali

fosfati di potassio, di sodio e di ammonio, o perfosfati, ma tutti derivano da fonti minerali. Il fosforo è assimilato dalle cellule principalmente come ortofosfato, tuttavia anche altre forme, organiche e inorganiche, possono essere impiegate per la crescita delle microalghe (Markou 2014). La capacità del fosforo organico disciolto (DOP) di essere assunto dalla cellula dipende dalla sua composizione e complessità chimica. Tuttavia, la maggior parte dei composti organici di fosforo non sono direttamente assimilabili dalle microalghe e devono prima essere mineralizzati (Markou 2014). Nel caso di forme di fosforo inorganico diverse dall'ortofosfato, esse devono comunque essere convertite in tale forma, mediante enzimi fosfatasi, per poter essere assimilate (Markou 2014). La velocità di assorbimento del fosforo è influenzata da diversi fattori, quali l'energia disponibile (luce), pH, temperatura, salinità / forza ionica del mezzo di coltura e ioni disponibili quali K^+ , Na^+ , Mg^{2+} . In letteratura si trovano dati contrastanti quando si vogliono confrontare la produttività e la velocità di assorbimento ottenuti utilizzando fosforo in forma organica piuttosto che inorganica.

Le microalghe infine sono in grado di accumulare nella cellula riserve di polifosfati granulari, e tale riserva di fosforo viene utilizzata nel caso di un impoverimento di fosfato nell'ambiente circostante. Questo comportamento è noto come *luxury uptake* (Markou 2014). Questa capacità di accumulare l'eccesso di fosforo può essere sfruttata per rimuovere questo elemento dalle acque reflue (Powell et al., 2011). Tuttavia, in colture in cui vengono impiegati fertilizzanti sintetici, il *luxury uptake* dovrebbe essere evitato, al fine di massimizzare la resa di biomassa su concentrazione nutritiva fornita.

Con l'aumento del pH dovuto alla fotosintesi e all'alcalinizzazione del mezzo di coltura, i cationi polivalenti, come calcio e magnesio, possono precipitare con i fosfati, e ciò può ridurre la disponibilità di fosforo (Markou 2014): in particolare questo si verifica se si impiega come mezzo di coltura acque reflue, il cui contenuto di cationi bivalenti è alto.

1.6 Potassio, zolfo e micronutrienti

Per una crescita microalgale senza limitazioni, il mezzo di coltura deve contenere oltre a carbonio, azoto, e fosforo (i cosiddetti macronutrienti) anche diversi altri micronutrienti, quali : K, Mg, S, Ca, Na, Cl, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, B e Co.

Il potassio, il cui contenuto nella biomassa varia in genere tra l'1.2% e l'1.5%, svolge un significativo ruolo biologico, come attivatore di enzimi coinvolti nella fotosintesi e respirazione cellulare, e anche nella sintesi di proteine e carboidrati. Generalmente viene fornito in forma di Sali (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , KSO_4 , KCl e altri). Il magnesio è un elemento essenziale per la produzione di biomassa microalgale, e il suo contenuto è compreso tra 0,35% e 0,7% in peso

sebbene una percentuale di 7,5% sia stata rilevata in alcune specie (Markou 2014). Esso partecipa a processi cellulari vitali, ed è inoltre un attivatore per diversi enzimi importanti. Il magnesio è fornito principalmente come $MgSO_4$, tuttavia diversi altri sali di magnesio sono disponibili e possono essere usati, ad esempio $(NH_4)_2SO_4$ e $MgSO_4$, $MgCl_2$, $MgHPO_4$, $Mg(NO_3)_2$ e altri. Spesso i terreni non sintetici utilizzati per la coltura delle alghe (come ad esempio effluenti di digestione anaerobica, o la fase acquosa del processo di *hydrothermal liquefaction*) sono carenti di magnesio ed è quindi necessaria una sua aggiunta.

Lo zolfo è un altro nutriente significativo per la crescita di microalghe, con un contenuto nella biomassa che varia da 0,15% a 1,6% (Markou 2014): esso va a costituire alcuni amminoacidi, solfo lipidi, vitamine e altri composti. Nonostante esistano differenti forme in cui lo zolfo può trovarsi, le microalghe preferiscono assumerlo nella forma di solfato (SO_4^{2-}), mentre altre forme, come solfuro, risultano tossiche (Markou 2014). In ambienti marini la concentrazione di solfato è relativamente elevata (29 mM) e per questo si ritiene improbabile che sia un fattore che possa limitare la crescita di microalghe marine (Markou 2014, Giordano et al, 2008; Hawkesford, 2008). Alcuni reflui industriali, come quelli derivati dalla macinazione di carta, dalla trasformazione dei prodotti alimentari e dalla distilleria, sono molto ricchi di solfati, e pertanto possono essere utilizzati come fonte di zolfo per quei terreni che ne sono invece carenti (Markou 2014).

Tra gli oligoelementi, il ferro è essenziale ed è fortemente richiesto dalle microalghe. Essendo un metallo di transizione, esso è associato agli enzimi mediante la formazione di gruppi complessi per sintetizzare vari amminoacidi. Il ferro è inoltre coinvolto in processi enzimatici fondamentali, come il metabolismo dell'ossigeno, il trasferimento di elettroni, l'assimilazione dell'azoto, la sintesi del DNA, RNA e della clorofilla (Naito et al, 2005; Straus, 2004). Tuttavia, ha alcune caratteristiche fisico-chimiche che riducono la biodisponibilità: in ambiente acquoso ossidante, infatti, il Fe^{2+} si ossida rapidamente in Fe^{3+} , e quest'ultimo precipita formando ossidi e idrossidi insolubili. Negli ambienti naturali, e in acque reflue domestiche, il ferro è spesso non disponibile e questo può limitare la crescita delle microalghe (Mostafa Mahmoud e 2012, Della Sonda e Huntsman, 1995). Pertanto, esso è spesso fornito nelle colture sotto forma di chelati complessi, che lo rendono biodisponibile.

1.7 Riciclo di nutrienti per una produzione sostenibile delle microalghe

Come già anticipato, i nutrienti rappresentano un costoso input nella produzione industriale di biomassa microalgale, poiché sono richieste grandi quantità di azoto, fosforo e micronutrienti per la loro crescita. Valori riportati da (Heilmann et al.) forniscono che per una tonnellata di biomassa con

una composizione $CO_{0.48} H_{1.83} N_{0.11} P_{0.01}$ sono necessari 45 kg di azoto, 4 kg di fosforo come si evince dai rapporti stechiometrici. Nel caso in cui la produzione industriale di biomassa algale prendesse piede, la competizione con le industrie agricole per i fertilizzanti organici aumenterebbe causando un innalzamento inevitabile dei prezzi dei nutrienti. Storicamente il prezzo dei fertilizzanti è strettamente legato a quello del combustibile fossile; se quest'ultimo cresce, anche quello dei fertilizzanti è destinato anch'esso ad aumentare, con la conseguenza di rendere la produttività di biofuels da microalghe un processo non competitivo e svantaggioso.

Quando si parla di nutrienti l'attenzione è rivolta maggiormente all'azoto, al carbonio e al fosforo che secondo alcuni autori (Vaccari., D. Jones, et al., 2013) rappresenterà uno dei problemi centrali per la sostenibilità dell'intero processo. Da tutte le considerazioni sopra esposte si conclude che riciclare i nutrienti sia un passaggio vitale per rendere il processo più sostenibile e fattibile economicamente su scala industriale.

Tabella 1.2 contenuto in percentuale del peso secco in termini di proteine, carboidrati, lipidi di alcune alghe (Moscoso 2013)

ALGA	Protein	Carbohydrates	Lipids
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9

Come si può vedere dalla tabella 1.2, la maggior parte delle microalghe ha un alto contenuto proteico, perciò il loro contenuto in azoto varia dal 4 all'8 % su base ponderale. Queste proteine, una volta estratti i lipidi, rimangono inutilizzate, pertanto il contenuto dell'azoto viene disperso. Esistono diverse tecnologie che mirano a recuperare i nutrienti rilasciati. L'attenzione per molto tempo si è rivolta verso la digestione anaerobica ma negli ultimi tempi è sempre più focalizzata sui processi cosiddetti *hydrothermal*. Entrambi sono discussi ampiamente nei paragrafi seguenti.

1.7.1 Digestione anaerobica integrata alla produzione di biofuel da microalghe

La digestione anaerobica di microalghe prevede la loro degradazione per opera di microrganismi (batteri digestivi) in assenza di ossigeno molecolare. Il processo si sviluppa in quattro stadi: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. Le molte reazioni coinvolte portano alla formazione di una vasta gamma di prodotti, sottoprodotti e intermedi di reazione. Dal punto di vista globale la digestione anaerobica integrata all'interno di un processo di produzione di biodiesel porta alla formazione di metano e di digestato ricco di nutrienti e micronutrienti adatto alla crescita di

microalghe (Ward 2014). Il digestato è la parte liquida che si ottiene a fine digestione dopo la separazione dai fanghi digestivi e residui vari. Sebbene il digestore sia il fulcro del processo in esso sono previste altre unità fondamentali, come illustrato nella figura 1.3.

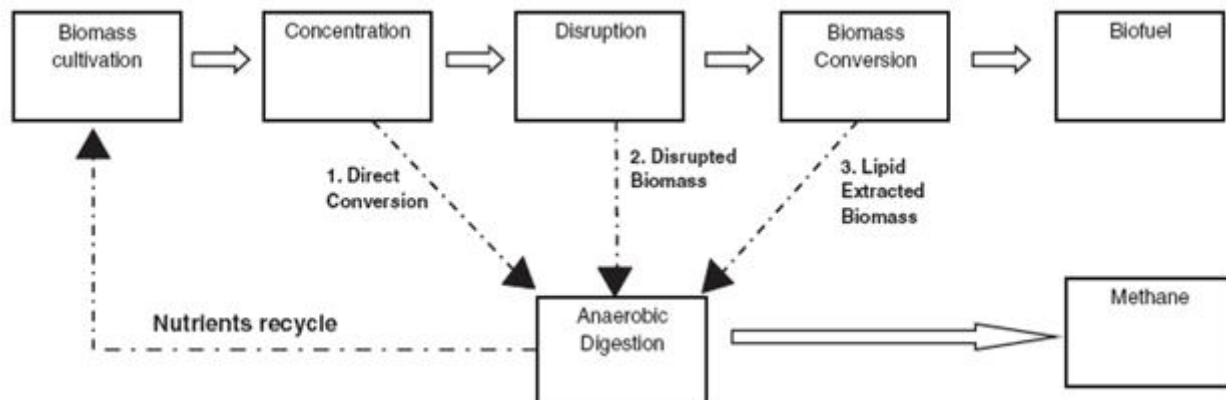


Figura 1.3 Schema concettuale di processo di digestione anaerobica integrata alla produzione di biofuel da microalghe con riciclo integrato di nutrienti (Ward 2014)

Prima di entrare nel digestore la biomassa necessita di essere concentrata (vedi 1.8.1.2). A questo punto può essere digerita direttamente e/o pretrattata (meccanicamente, fisicamente e/o chimicamente) e/o sottoposta all'estrazione dei lipidi. In quest'ultimo caso dalla digestione anaerobica si ottiene una minore quantità di metano (Ward 2014). Dal processo di digestione si produce dunque un digestato ideale per la coltivazione di specie microalgali, che può quindi essere riciclato e usato come alimentazione nel fotobioreattore. Dati di letteratura (Ward 2014) riportano valori di concentrazione di nutrienti presenti nel digestato di 2940 mg/L di ammoniaca, 390 mg/L di fosforo totale e 320 mg/L di potassio. Se il contenuto lipidico delle microalghe è minore del 40% è maggiormente favorevole dal punto di vista economico non estrarre i lipidi ma lasciare che parte di essi vada a produrre biogas (Ward 2014). D'altra parte i lipidi se molto concentrati possono causare inibizione al processo per via dei loro intermedi di reazione (lunghe catene di acidi grassi): per contenuti del 5,10 e 18% di lipidi infatti non si verifica nessun effetto inibente (Ward 2014), ma già a 30% questo fenomeno si manifesta, perciò pur non essendo vantaggioso in tal caso estrarre i lipidi bisogna comunque allontanarli dal processo.

Residui di cloroformio, solvente tipicamente utilizzato per l'estrazione, possono avere un effetto inibente sulla digestione anaerobica, mentre butanolo esano e metanolo non l'hanno mai manifestato. Quando la composizione di C,H,O e N del substrato è nota, la resa di metano può essere stimata come:

$$\text{Resa di metano (L/g)} = \left(\frac{4a+b-2c-3d}{12a+b+16c+14d} \right) * V_m \quad (\text{equazione 1.1})$$

Dove V_m è il volume molare del metano a 0°C e 1 atm, mentre a, b, c e d sono la composizione molare nell'alga di carbonio idrogeno, ossigeno e azoto rispettivamente ($C_aH_bO_cN_d$), mentre con VS si indica il solido volatile digeribile (Ward 2014).

1.7.1.1 Problemi connessi alla digestione anaerobica

Nonostante la digestione anaerobica rappresenti un'alternativa al terreno sintetico, ad oggi sono ancora numerosi i problemi da risolvere: la concentrazione e pretrattamenti della biomassa previa digestione, l'alimentazione al digestore con un corretto rapporto di carbonio e azoto, la presenza di inibitori di crescita.

1.7.1.2 Basse concentrazioni di substrato

Diversi autori (citati nel Ward 2014) sono arrivati alla conclusione che la biomassa, prima di essere inviata al digestore, debba essere concentrata al fine di aumentare le prestazioni del processo. Difatti utilizzando biomasse con valori troppo bassi di VS (ovvero la parte solida volatile contenuta nella biomassa algale, nonché la parte digeribile di essa) hanno fornito risultati deludenti (Ward 2014). L'eccessiva diluizione porta al fallimento della digestione e alla diminuzione (per wash-out) della comunità batterica. Diverse ricerche hanno evidenziato numerosi problemi ingegneristici nel concentrare e disidratare la biomassa algale. Altri studi (Ward 2014.) hanno dimostrato come l'uso di flocculanti e coagulanti portano delle migliorie, e che (Zamalloa) l'uso di reattori contenenti membrane o filtri che regolano diversamente le ritenzioni idriche della carica può essere vantaggioso.

1.7.1.3 Degradabilità delle pareti cellulari e pretrattamenti

Le pareti cellulari delle microalghe, soprattutto quelle a base di spirocollina (*S.obliquus*), non sono facilmente attaccabili dai batteri anaerobi, e ciò riduce la resa dell'intero processo di digestione. La degradabilità delle pareti cellulari microalgali è strettamente legata alla resa di biogas prodotto, perciò diversi autori hanno sottolineato che il pretrattamento è un passaggio necessario per rendere la biomassa più attaccabile durante la digestione anaerobica, oltre che per favorire la fase di estrazione dei lipidi finalizzata alla produzione di biodiesel (Ward 2014). Sono stati sperimentati diversi tipi di pretrattamenti: meccanico, fisico, termo-chimico, enzimatico. Molti autori (citati nel Ward 2014) concordano che il solo pretrattamento chimico che prevede l'uso di NaOH non è sufficiente. Nel pretrattamento di tipo termico-chimico l'idrossido di sodio è usato per controllare il

valore del pH, e la biomassa è esposta a temperature elevate per favorire la distruzione delle pareti cellulari (Ward 2014). Tutti gli esperimenti condotti in queste condizioni a diversi tempi di esposizione, hanno prodotto risultati positivi: in particolare, si è arrivati ad un aumento del 33% della produttività del gas pretrattando la biomassa a 100°C per 8h. Per *Scenedesmus* sp. il pretrattamento termico a 90°C ha portato ad un aumento della produzione di metano del 57% rispetto a quello non trattato. Altri autori (citati nel Ward 2014) in seguito hanno messo a confronto i pretrattamenti termo-chimici (uso combinato di calore e NaOH) e quelli ultrasonici, notando che la degradazione del substrato aumentava con la temperatura e che con la tecnologia sonica si raggiungevano risultati molto simili (aumento della biodegradabilità del 43%) a quelli dell'uso combinato di calore e NaOH, ma con il gran vantaggio che i tempi richiesti per questo pretrattamento erano di 10 min piuttosto che di 1h. Altro pretrattamento interessante è l'idrolisi ad alte pressioni (HPTL), che prevede un trattamento della biomassa a 160°C per 20-30 min e 6 bar, e una successiva brusca riduzione della pressione, che provoca la distruzione delle pareti cellulari. Quando l'HPTL viene combinata con l'estrazione di lipidi, si ha un aumento della digeribilità della biomassa algale e del processo di estrazione pari al 110% (Ward 2014). Dai bilanci totali di energia si è dimostrato che l'HPTL è un trattamento oneroso, però se combinata con la digestione anaerobica esso risulta comunque positivo.

1.7.1.4 Il rapporto C/N associato alla biomassa microalgale

Dai dati di letteratura si evince che il rapporto carbonio azoto C/N varia da 4,16 a 7,82 nelle specie algali sperimentate per la digestione anaerobica (Ward 2014). Quando il rapporto C/N è inferiore a 20 l'apporto di carbonio e azoto risulta essere sbilanciato per la crescita dei batteri digestivi. Tale sbilanciamento fa sì che l'azoto in eccesso venga rilasciato sotto forma di ammoniaca, notoriamente tossica per i batteri richiesti nella metanogenesi. Inoltre esso favorisce l'accumulo di acidi grassi volatili (VFA, volatile fatty acid). Sia l'ammoniaca che i VFA sono degli importanti intermedi di reazione, ma nel caso di accumulo nel digestore divengono inibitori per i batteri (Ward 2014.). Per superare tale problema è stata sperimentata la co-digestione, in cui le microalghe vengono digerite assieme ad altra biomassa (sterco, rifiuti di carta) in modo che il rapporto C/N aumenti e diminuisca così il rilascio di ammoniaca (Ward 2014.). I risultati hanno riportato un aumento della produzione di biogas, ma soprattutto un minore effetto inibitorio dell'ammonica. Diversi autori concordano che il migliore rapporto tra carbonio e azoto per la digestione anaerobica si aggiri attorno 20:1, 25:1, e 30:1 (Ward 2014.).

1.7.2 Inibitori della digestione anaerobica

1.7.2.1 Tossicità dell'ammoniaca

A seguito della digestione anaerobica, macromolecole come le proteine (molto abbondanti nelle microalghe) e urea producono quantità elevate di ammoniaca. L'equilibrio tra la forma non ionizzata NH_3 (ammoniaca) e NH_4^+ (ammonio) è influenzato da temperatura e pH e un loro aumento causa lo spostamento verso NH_3 , che risulta essere tossica per i batteri digestivi. Più precisamente, l' NH_3 è tossica per i batteri che effettuano la metanogenesi, prima di tutto perché inibisce l'azione enzimatica che porta alla produzione del metano; inoltre l'idrofobicità dell' NH_3 ne consente la diffusione passiva nella cellula causandone forti scompensi. In letteratura si trovano dati contrastanti dei limiti di concentrazioni ammesse di NH_3 , ma sembra assodato che esse dipendano da fattori come periodo di acclimatazione, natura del substrato, inoculo utilizzato e condizioni operative (Ward 2014.).

1.7.2.2 Lo Zolfo e il suo ruolo all'interno della digestione

La biomassa microalgale contiene bassi livelli di amminoacidi solforati e la loro digestione rilascia concentrazioni di idrogeno solforato più basse rispetto ad altri substrati. I composti dello zolfo possono agire da elettrone-accettori, attaccando i batteri digestivi e passando così in forma gassosa come idrogeno solforato, prodotto particolarmente corrosivo per i macchinari che sono a valle della digestione. Le cellule per il loro metabolismo necessitano di solfuro ma a basse concentrazioni, e già concentrazioni pari a 200 mg/L risultano estremamente tossiche. Il solfuro risulta maggiormente tossico nella sua forma non ionizzata, e l'equilibrio con la forma ionizzata dipende da temperatura e pH (Ward 2014).

1.7.2.3 Microalghe saline ed effetto della salinità

L'acqua salina utilizzata per far crescere le alghe marine può presentare diversi effetti inibenti quando poi esse vengono utilizzate nella digestione anaerobica. Un'alta salinità può disidratare le cellule batteriche per effetto della pressione osmotica, causando scompensi funzionali. I metalli ionici leggeri presenti nelle acque saline, come sodio, magnesio, calcio e alluminio possono risultare tossici se presenti in alte concentrazioni. Tra questi citati, il più temuto è il sodio (Na^+), il cui effetto inibitore dipende strettamente dall'inoculo, dalla composizione globale dell'acqua salina e dal substrato digerito (Ward 2014).

1.7.3 Crescita microalgale in un digestato: velocità di crescita e produzione di biomassa

Nonostante l'uso dell'effluente della digestione anaerobica per la coltivazione microalgale possa contribuire a ridurre le esigenze delle sostanze nutritive, i costi e gli impatti ambientali associati a questa sono ancora poco studiati. Al giorno d'oggi, i pochi lavori di ricerca su questo argomento (citati da Uggetti 2014) mostrano risultati incoraggianti. La fase liquida (digestato) è spesso caratterizzata da elevata torbidità e contenuto di ammoniaca, che non viene ridotto durante la digestione anaerobica (Uggetti 2014). Tali caratteristiche possono essere responsabili di inibizione della crescita microalgale (Uggetti 2014), e i loro effetti devono essere dunque approfonditi. Uggetti et al. (2014) hanno condotto uno studio sulla crescita di microalghe utilizzando la fase liquida della digestione anaerobica di acque di scarico come substrato. In tabella 1.3 è riportato il confronto tra la caratterizzazione del substrato e quella dell'inoculo utilizzati nel lavoro citato.

Tabella 1.3 confronto tra caratterizzazione del substrato con quella dell'inoculo, in termini di nutrienti e micronutrienti, inquinanti (Uggetti 4014).

Parameter	Inoculum (microalgal/bacterial biomass)	Substrate (liquid phase of anaerobic digestate)
TSS (g/L)	2.00	1.13
Total COD (mg/L)	910	210
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	30	950
PO ₄ ²⁻ -P (mg/L)	17	415
Cl ⁻ (mg/L)	280	160
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	140	43
Na ⁺ (mg/L)	52	126
K ⁺ (mg/L)	220	240
Mg ⁺⁺ (mg/L)	24	3
Ca ⁺⁺ (mg/L)	80	65

In particolare, lo studio ha analizzato l'effetto del rapporto inoculo(biomassa)/substrato(terreno) sulla crescita di microalghe (velocità di crescita iniziale e produzione di biomassa). Le velocità di crescita misurate in questo lavoro variano in un intervallo compreso tra 0,04 d⁻¹ e 0,9 d⁻¹, a seconda del rapporto inoculo/substrato iniziale. In figura 1.4 è riportata la velocità di crescita in funzione della concentrazione di NH₃ inizialmente presente e della concentrazione iniziale di biomassa (definita come Total Suspended Solids TSS), per diversi valori di concentrazione iniziale del substrato (digestato).

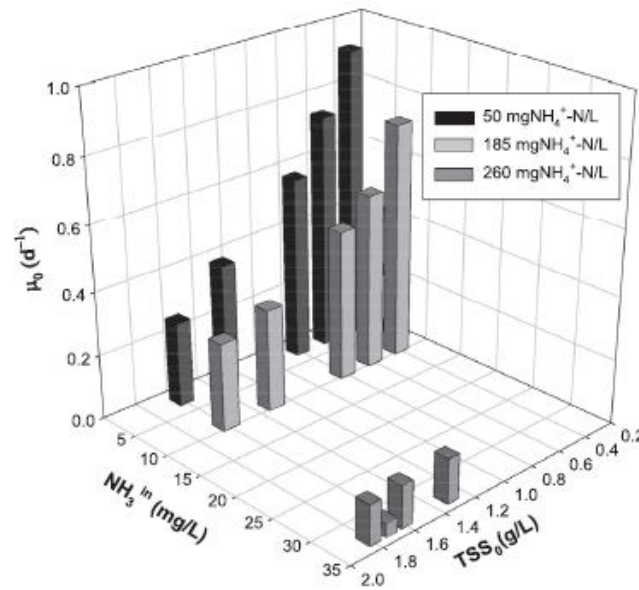


Figura 1.4 Tasso di crescita iniziale (μ_0) in funzione della concentrazione iniziale microalgale (TSS_0) e concentrazione iniziale di ammoniaca (NH_3^{IN}) per ogni concentrazione iniziale del substrato (Uggetti 4014).

Si esclude il caso in cui la concentrazione iniziale di nutrienti era massima (260 mgNH₄⁺-N/L), in cui la crescita è risultata nulla o molto bassa, gli altri risultati cadono all'interno di un intervallo già indicato da altri studi che utilizzano acqua di scarico come substrato: ciò sta a indicare che il digestato non ostacola la crescita delle microalghe. La velocità di crescita secondo gli stessi autori è inversamente proporzionale all'assorbanza della coltura misurata all'inizio dell'esperimento, ovvero alla concentrazione iniziale della microalghe: infatti essa diminuisce da 0.9-0.7 d⁻¹ a 0.4-0.3 d⁻¹ in seguito all'aumento di assorbanza. Gli autori ipotizzano che sia la concentrazione iniziale delle microalghe, più che la torbidità del digestato stesso, ad influenzare la diffusione della luce all'interno della coltura, e di conseguenza a ridurre la velocità di crescita. Un altro fattore che influenza la velocità di crescita è la concentrazione di ammoniaca (NH₃^{IN}). Quando essa è stata aumentata da 2 a 9 mg NH₃/L, gli autori hanno osservato una diminuzione della velocità di crescita del 18%, e di un ulteriore 77% con una concentrazione di 34 mgNH₃/L. Dunque, come già più volte anticipato, anche se l'ammoniaca è un'ottima fonte di azoto per la crescita microalgale, essa è tossica per la maggior parte di esse. Tuttavia, al fine di controllare l'inibizione da ammoniaca, il suo contenuto può essere ridotto diluendo il digestato.

Contrariamente alla velocità di crescita, la produzione di microalghe è direttamente proporzionale alla concentrazione di biomassa iniziale, come si può vedere in figura 1.5.

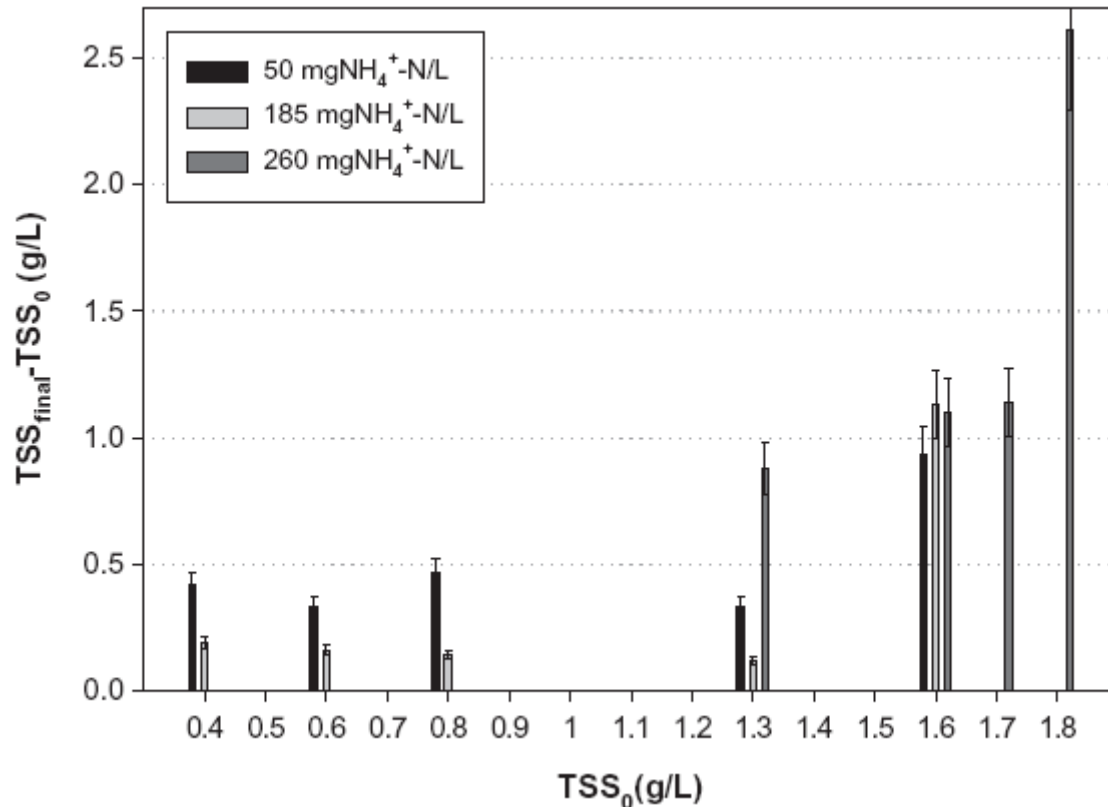


Figura 1.5 Produzione della biomassa (definita come differenza tra peso secco finale e iniziale) in funzione del peso secco iniziale, per ogni concentrazione iniziale del digestato (Uggetti 2014)

1.7.4 Processi “hydrothermal”

Per “hydrothermal process” si intende un processo che prevede la conversione della biomassa in un prodotto liquido, solido o gassoso attraverso il contatto con un mezzo acquoso, ad alte temperature e pressioni. Diverse varianti di processo sono state proposte. In generale, avvengono trasformazioni chimico-fisiche in condizioni di lavoro che variano tra i 200-600°C e 5-40 MPa. I processi in questione hanno il grande vantaggio energetico di non richiedere una previa essiccazione poiché funzionano con biomasse disperse in fase acquosa.

Diversi studi (Biller and Ross, 2011; Brown et al., 2010; Torriet al., 2012) hanno dimostrato come attraverso la *hydrothermal liquefaction* (HTL) si possa ottenere del biofuel ad alto potere calorifico. Inoltre, si ottiene come sottoprodotto un’elevata quantità di acqua di processo contenente carbonio, azoto, fosforo e altri minerali. Tale acqua, date le sue caratteristiche, può essere riciclata per la coltivazione delle microalghe, rendendo l’intero processo meno oneroso economicamente e ad impatto ambientale pressoché nullo (Biller 2012.). In letteratura vi sono diversi studi che dimostrano la fattibilità della crescita microalgale utilizzando come mezzo di coltura quello ottenuto

dal processo HTL (Biller 2012). Nei paragrafi seguenti i vari processi *hydrothermal* e le loro potenzialità di riciclo dei nutrienti vengono brevemente discussi.

1.7.4.1 Hydrothermal gasification (HTG)

La *hydrothermal gasification* (HTG) è un processo di idrolisi, relativamente veloce, che porta ad un rapido degrado della struttura polimerica della biomassa. Le reazioni si susseguono velocemente e portano alla formazione di gas a temperatura relativamente più bassa rispetto ai processi a secco. Sopra il punto critico, la minore densità del fluido supercritico (acqua) favorisce le reazioni dei radicali liberi e fornisce condizioni più favorevoli per la formazione di metano e di idrogeno. La biomassa viene gassificata principalmente a metano e biossido di carbonio, in presenza di un catalizzatore eterogeneo aggiunto in acqua in condizioni vicine a quelle critiche o a quelle supercritiche (350-400°C) (Jakob Breinl 2015). Alle alte temperature, in acqua supercritica, la biomassa viene convertita in gas ricco d'idrogeno senza catalizzatore o con catalizzatori non metallici (Jakob Breinl 2015).

1.7.4.2 Hydrothermal liquefaction (HTL)

Il processo di *hydrothermal liquefaction* (HTL) può essere utilizzato all'interno di un sistema chiuso con riciclo integrato di nutrienti. Esso è rivolto non solo alla produzione del *biocrude*, ma soprattutto ad una gestione più sostenibile dei nutrienti, essenziale per lo scale up del processo a livello industriale. Uno schema a blocchi è riportato in figura 1.6 (Biller 2012.). In questo caso si prevede un reattore di tipo slurry, in cui viene alimentata la biomassa umida. Le condizioni di lavoro sono tipicamente 200-350°C, a pressioni di 15-20 MPa per evitare la vaporizzazione. Durante la HTL le molecole complesse si rompono e ripolimerizzano in composti oleosi (Biller 2012). Dal reattore si estraggono: un prodotto gassoso composto per di più da CO₂, la quale può essere riutilizzata per la fotosintesi delle microalghe, e un prodotto liquido.

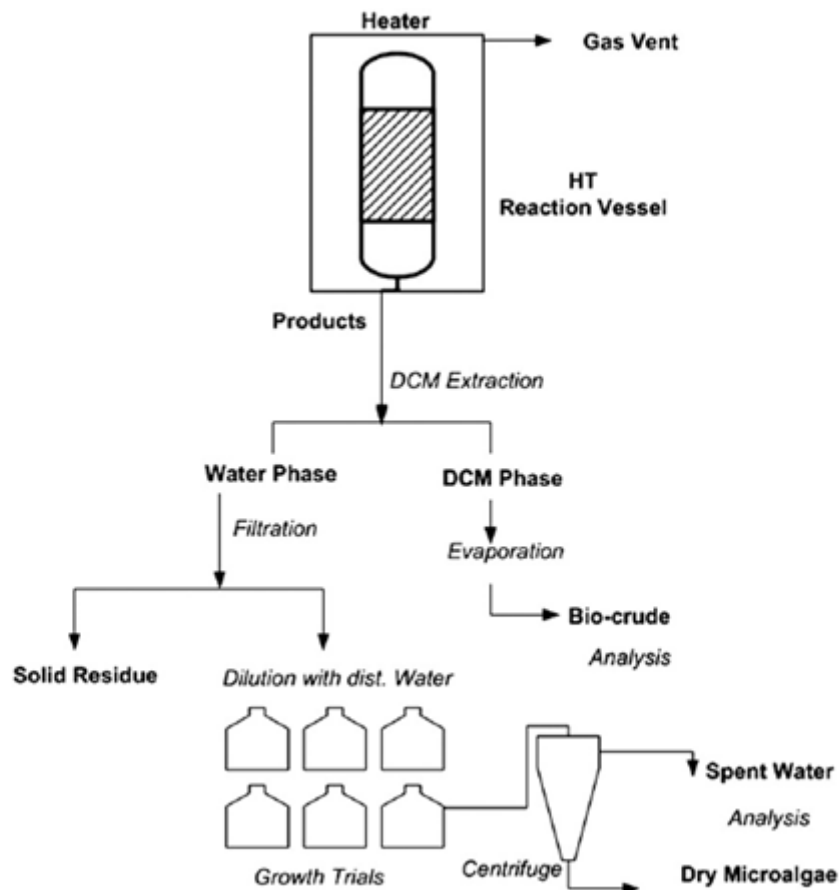


Figura 1.6 schema di processo HTL: reattore con formazione di gas (ricco in CO_2), separazione della frazione oleosa da quella acquosa (dopo estrazione con solvente), e successiva crescita in acqua riciclata di processo (Biller 2012)

Il prodotto liquido, composto da una frazione oleosa e da una acquosa, viene mandato in un'unità di separazione bifase dove, mediante solvente (tipicamente dicloroetano), vengono separati i lipidi che in seguito a raffinazione danno *biocrude*.

La fase acquosa, dopo essere stata filtrata per separare la parte solida, può essere utilizzata come alimentazione per la crescita microalgale. La parte solida è composta per lo più da cenere e materiale minerale, che può essere utilizzato ad esempio per fare *biochar* (Biller 2012.). La fase liquida ottenuta contiene altissime concentrazioni di NH_4^+ , PO_4^{3-} , K^+ , per cui deve essere sottoposta a pesanti diluizioni per raggiungere concentrazioni simili a quelle tipicamente utilizzate nella coltivazione di microalghe. Con i nutrienti e micronutrienti vengono diluiti anche il nichel (proveniente dalle alghe ma anche dall'erosione delle pareti del reattore), il fenolo (formatosi dalla decomposizione delle proteine) e acidi grassi, tutti inibitori di crescita spesso presenti. In letteratura (Biller 2012) vengono riportati diversi esperimenti condotti secondo lo schema di processo sopra illustrato. Sono state sperimentate varie specie algali e condizioni di lavoro, ottenendo risultati molto diversi in termini di resa di *biocrude* e valore ottimo di diluizione della fase acquosa (finalizzato alla maggiore crescita algale). Secondo quanto riportato nel lavoro suddetto, che ha

usato sia microalghe che ciano batteri, si è visto che questi ultimi oltre a dare *biocrude* di buona qualità e alta resa (la massima resa qui trovata era del 47% per *Chlorella* a 300°C), hanno prodotto una fase acquosa ricca di tutti i nutrienti necessari per la crescita delle microalghe, secondo quanto riportato in tabella 1.4

Tabella 1.4 composizione dell'acqua di processo, ottenuta a diverse temperature e specie algali, confrontata con un terreno standard di coltura (Biller 2012).

(ppm)	<i>Chlorogloeopsis</i> 300 °C	<i>Spirulina</i> 300 °C	<i>Chlorella</i> 300 °C	<i>Chlorella</i> 350 °C	<i>S.</i> <i>dimorphus</i> 350 °C	3N- BBM +V*
pH	8.9	8.9	9	9.2	8.4	6.8
TOC	9060	15,123	11,373	13,764	11,119	-
Total N	5636	8136	6636	6888	3139	124
NH ₄ ⁺	4748	6295	5673	5920	5280	-
PO ₄ ³⁻	280	2159	3109	1121	1470	153
K	303	1506	1460	1419	1150	63
Acetate	2146	7131	4106	5378	1290	-
NO ₃ ⁻	508	194	329	237	192	547
Ni	3.8	0	0.1	0.4	0.8	-
Phenols	178	98	108	158	80	-

La disponibilità dei nutrienti e micronutrienti nella fase acquosa, è molto maggiore rispetto a quella del terreno di coltura standard, e dipende fortemente dalla costituzione biochimica dell'alga utilizzata e dalle condizioni di lavoro (in particolare dalla temperatura). A temperature maggiori si hanno rotture più severe delle molecole complesse e quindi una maggiore disponibilità dei componenti, a discapito però della resa del *biocrude*, che ad esempio nel caso di *Chlorella* diminuisce da 47% a 35,8% quando si passa da 300°C a 350°C. Questo studio mostra che la crescita nella fase acquosa delle specie algali considerate necessita di una forte diluizione con acqua distillata. Tutte le specie hanno dimostrato di essere in grado di utilizzare ammonio come fonte di azoto e di crescere nel pH alcalino dovuto alla sua presenza. Il grado di diluizione ha giocato un ruolo fondamentale per la crescita: si è osservato che se esso è basso la concentrazione delle specie inibenti è ancora troppo alta, risultando così tossica per la crescita, se invece la diluizione è spinta, la disponibilità dei nutrienti si esaurisce in breve tempo. In sintesi, ciascuna specie ha dimostrato un grado di diluizione ottimale per la crescita che va individuato caso per caso (Biller 2012).

Tabella 1.5 *Pesi secchi delle microalghe e cianobatteri cresciute in acqua riciclata di processo diluita con gradi di diluizione diversi, ottenuti a diverse condizioni di temperatura (Biller 2012) confrontati con quelli ottenuti su un terreno sintetico (Media).*

	Process water dilutions for growth media					Media*
	50×	100×	200×	400×	600×	
<i>Chlorogloeopsis</i> 300 °C	No growth	124 ± 10	NA	498 ± 99	NA	386
<i>Spirulina</i> 300 °C	No growth	No growth	NA	657 ± 92	NA	706
<i>Chlorella</i> 300 °C	449 ± 18	877 ± 280	NA	459 ± 78	NA	1020
<i>Chlorella</i> 350 °C	No growth	NA	94 ± 19	47 ± 3	30 ± 3	79
<i>Scenedemus</i> 350 °C	No growth	NA	33 ± 2	48 ± 3	28 ± 1	117

È interessante notare che durante lo studio si è osservata una crescita mixotrofica per tutte le specie e che il substrato responsabile di ciò si è l'acetato, ma anche il carbonio organico. *Chlorogloeopsis* a 400× di diluizione e *Chlorella* a 350 °C t 200× di diluizione hanno raggiunto alto contenuto di biomassa grazie alla crescita mixotrofica, come si può osservare in tabella 1.5.

1.7.4.3 hydrothermal carbonization (HTC)

Il processo di hydrothermal carbonization (HTC) prevede il trattamento della biomassa in mezzo acquoso (tipicamente 10-25% di solidi in peso) in un reattore di tipo slurry, a condizioni di temperatura e pressione più moderate rispetto alla precedente HTL (tipicamente 190-250 °C e pressione di saturazione dell'acqua). I prodotti di reazione sono costituiti da una fase solida (hydrochar), nella quale sono trattenuti i lipidi, e da una fase acquosa sterile e ricca di nutrienti che può essere utilizzata per la crescita algale come corrente di alimentazione al fotobioreattore. In figura 1.7 viene riportato un esempio di scema a blocchi in cui si vede come il processo termico vada a convertire la biomassa algale umida in biodiesel grazie anche all'ausilio dell'unità che effettua la transesterificazione in situ dei lipidi.

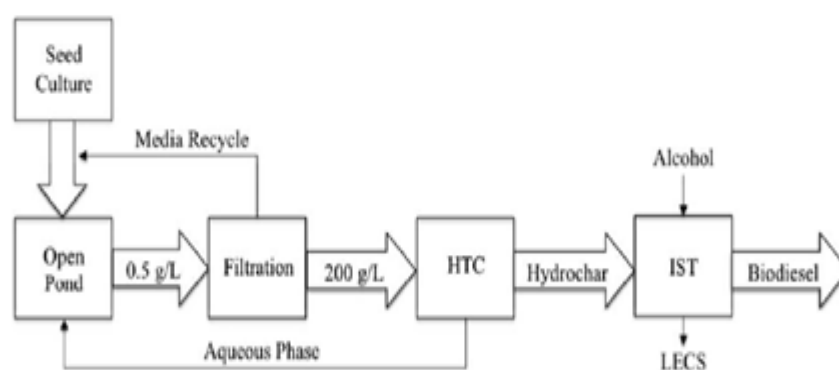


Figura 1.7 schema a blocchi di un processo che usa HTC, con riciclo integrato e produzione di biodiesel, previa *trans* esterificazione *in situ* (Savage 2013).

Le condizioni di temperatura e tempo di permanenza (circa 200°C, 40 minuti) influenzano le resa del processo, e della frazione solida (definita come il rapporto tra *hydrochar* secco e la biomassa secca alimentata), la resa dei lipidi (calcolata come il rapporto tra i lipidi contenuti nell' *hydrochar* e quelli nella biomassa alimentata) e il rilascio di nutrienti nella fase acquosa. Il rilascio diazoto, fosforo e carbonio, è risultato maggiore alle più alte temperature, così come la resa dei lipidi, per la quale esistono però una temperatura e un tempo di residenza critici oltre i quali si registra invece una diminuzione (Savage 2013). La resa del solido diminuisce con la temperatura e con il tempo di residenza nel reattore. Alcuni studi (Zhenyi Du, 2012) hanno approfondito la fattibilità di crescita nella fase acquosa ottenuta dal processo HTC, in particolare utilizzando *Chlorella vulgaris*. Gli autori di questo studio hanno riportato che l'acqua ottenuta da HTC della biomassa a 200°C per 40 min risultava particolarmente idonea alla crescita microalgale (in tabella 1.6 si riporta la sua caratterizzazione).

Tabella1.6 Caratterizzazione dell'acqua di processo ottenuta da HTC (Zhenyi Du 2012).

Parameters	Concentration (mg/L)	Metals	Concentration (mg/L)
COD	134800 ± 2287	K	775.45
TOC	45700 ± 1513	Mg	4.025
TN	9650 ± 1582	Mn	0.01
Ammonia	1343 ± 75	Fe	3.085
Nitrate	211 ± 20	Na	8966
Nitrite	3.63 ± 0.73	B	1.855
TP	343 ± 43	Ni	0.005
		Cr	0.115

Nella tabella si vede come le concentrazioni di nutrienti siano anche in questo caso molto superiori a quelle presenti in un terreno standard di coltura. Lo stesso studio confronta la crescita di *C. vulgaris* ottenuta in BG-11 con quelle ottenute facendo crescere la stessa specie nell'acqua di

processo a diversi gradi di diluizione (50x, 100x, 200x). Come riportato nella Figura 1.8, per ciascun grado di diluizione la produttività di biomassa è risultata più alta rispetto a quella del terreno standard: in particolare è stato pari a 0.013, 0.160, 0.092 e 0.054 g/ L per BG-11, 50x, 100x e 200 x rispettivamente.

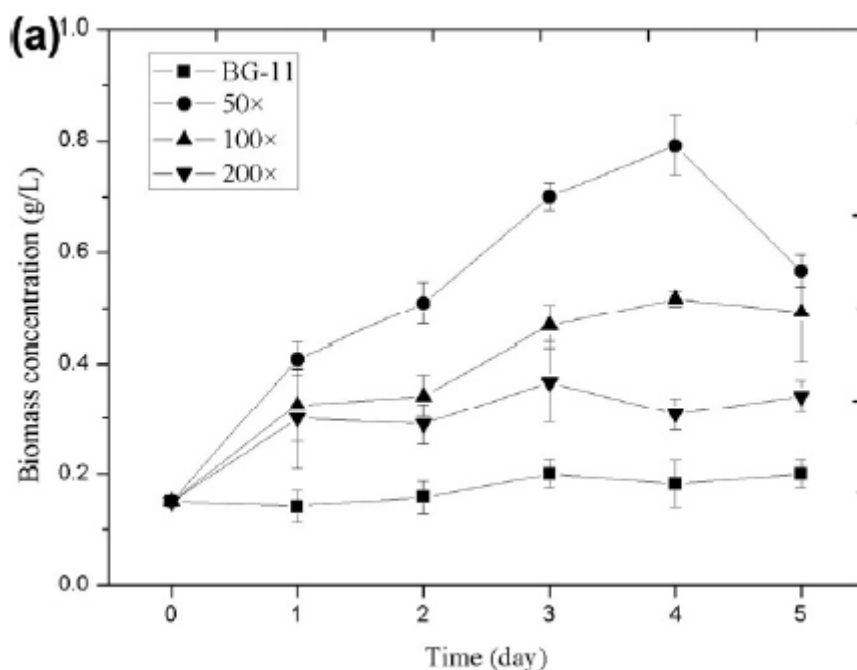


Figura 1.8 peso secco in (g/L) in funzione del tempo, parametrizzato in funzione dei diversi mezzi di coltura sperimentati (Zhenyi Du 2012).

La produttività massima è stata ottenuta con il grado di diluizione minore, diversamente da quanto accadeva nel processo HTL: nel processo HTC infatti le proteine e i polisaccaridi, per le diverse condizioni di lavoro, non vengono convertiti in prodotti che inibiscono la crescita ma al contrario in prodotti che costituiscono un ulteriore sorgente di azoto e carbonio (Zhenyi Du 2012). Anche in questo lavoro si è ribadito come la crescita mixotrofica può essere la causa dell'aumento della produzione di biomassa rispetto alla crescita autotrofa che sfrutta solo CO₂ (carbonio inorganico), come nel BG11. I consumi dei nutrienti durante la crescita per le diverse diluizioni sperimentate variano dal 45.5–59.9% per N, 85.8–94.6% per il P e 50.0–60.9% per il COD, (Zhenyi Du 2012). Infine la produzione di FAME in termini di resa è dell' 11.2% (50x), 11.2% (100x) e 9.7% (200x) , valori significativamente più alti del 4.5% ottenuto con BG-11 (Zhenyi Du 2012).

1.7.4.4 Flash hydrolysis (FH)

La *flash hydrolysis* (FH) di materiale algale è un trattamento simile a quelli precedenti, che avviene ad alte temperature (circa 300°C) e pressioni (20 MPa), in condizioni subcritiche ma caratterizzato da tempi di residenza nel reattore molto bassi (10 s): si tratta di un processo che mira a idrolizzare selettivamente dei biopolimeri (le proteine) e preservarne altri (i lipidi) (Moscoso 2013). Il processo richiede un controllo molto attento della temperatura ma soprattutto del tempo di permanenza, in modo da controllare il grado e l'entità della degradazione dei biopolimeri, ovvero la composizione e quindi la selettività del prodotto desiderato. I vantaggi della FH sembrano essere numerosi (Moscoso et al., 2013): non si formano sostanze tossiche come nel caso della *hydrothermal liquefaction* (HTL), il reattore può lavorare in continuo, il solido che si produce è un intermedio adatto alla produzione di biofuel, si usa come reagente acqua (con vantaggio sia economico che ambientale) che inoltre ha il compito di solubilizzare le proteine e composti inorganici (P, S, K, Na, Ca, altri) particolarmente adatti al riciclo di nutrienti. Moscoso et al., 2013 hanno condotto uno studio sulla *flash hydrolysis* di *Scenedesmus* sp., con il fine di ottimizzare le condizioni di temperatura e tempo di permanenza in modo da massimizzare la solubilizzazione delle proteine nell'acqua.

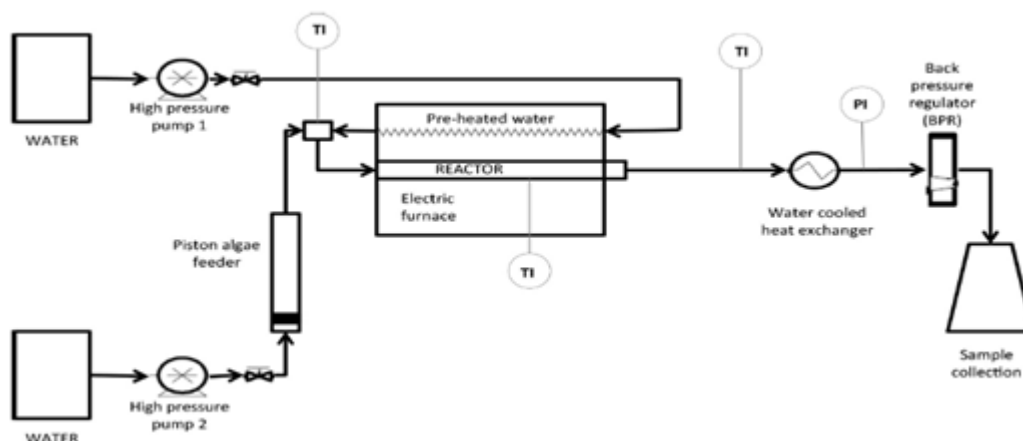


Figura 1.9 schema a blocchi di un processo che utilizza la FH al fine di solubilizzare i nutrienti in un mezzo acquoso

In figura 1.9 viene riportato lo schema dell'impianto sperimentale utilizzato nello studio. Nella tabella 1.7 sono riportati il contenuto, in peso, di carbonio e azoto misurati nell'idrolizzato e nella frazione solida rispetto alle quantità presenti nella biomassa iniziale, e la percentuale di solido (intermedio di biofuel) ottenuta, alle diverse temperature considerate. Nella fase liquida, le proteine

sono state idrolizzate a oligopeptidi (in maggiore quantità) e amminoacidi liberi, e la percentuale di azoto recuperato varia dal 30% al 66%, a seconda della temperatura. In particolare, il valore più alto di recupero dell'azoto è stato misurato a 280°C.

Tabella 1.7 Percentuale di C e N misurati nell'idrolizzato e nell'intermedio solido rispetto al contenuto iniziale, e percentuale di frazione solida ottenuta, in funzione della temperatura (Moscoso et al., 2013)

Sample	Temperature (°C)	Carbon accounted (wt%)	Nitrogen accounted (wt%)	Biofuels intermediate recovery (wt%)
Run1	205	82,9	74,1	52,1
Run 2	240	90,9	83,2	38,5
Run 3	280	90,9	84,5	30,0
Run 4	305	91,0	85,3	26,7
Run 5	325	88,0	82,8	24,0

Inoltre la fase acquosa (idrolizzato), dopo essere stata liofilizzata, presenta una composizione elementare di 48,05% di carbonio, 11,36% di azoto e 7,12% di idrogeno, in peso. Le diverse forme in cui l'azoto si trova nell'idrolizzato possono essere utilizzabili dalle alghe per la loro crescita. La parte solida contiene invece i lipidi (composti intermedi per produrre biofuel) facilmente estraibili con una miscela di solventi (ad esempio metanolo e cloroformio).

1.8 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è innanzitutto verificare in sistemi batch che la crescita microalgale sia possibile in un terreno di coltura riciclato da altri processi. In particolare i terreni testati per la crescita sono due: un digestato ottenuto dalla digestione anaerobica di microalghe, e un idrolizzato ottenuto dal processo di *flash hydrolysis*. In entrambi i casi si sono misurate la velocità di crescita e la concentrazione finale di biomassa, che sono state confrontate con i parametri ottenuti in terreni sintetici, focalizzando l'attenzione anche sul consumo di nutrienti. Nel caso della *flash hydrolysis* si è misurata la crescita microalgale anche in sistemi in continuo, studiando l'effetto della concentrazione iniziale di nutrienti e del tempo di residenza sulla produttività, al fine di ottimizzare l'apporto di nutrienti forniti.

Capitolo 2

Materiali e metodi

In questo capitolo sono esposte le metodologie analitiche e gli apparati sperimentali utilizzati per lo studio. In particolare, sono presentate le specie algali e i rispettivi reattori utilizzati negli esperimenti. Vengono poi fornite le caratterizzazioni dei vari terreni adottati per la crescita algale: terreno standard (BG11), digestato e idrolizzato. Si continua spiegando i vari metodi utilizzati per monitorare la crescita microalgale, e infine vengono riportati i metodi analitici impiegati per caratterizzare le concentrazioni dei vari nutrienti di interesse.

2.1 Specie algali e sistemi di crescita

La specie microalgale impiegata per studiare la crescita sul digestato è *Chlorella protothecoides*, in quanto rispetto alle altre specie algali essa è più resistente e meno sensibile alle contaminazioni facilmente presenti nel digestato. Inoltre *Chlorella protothecoides* è spesso utilizzata in quanto si contraddistingue per la sua alta produttività di lipidi e velocità di crescita.

Per la crescita su idrolizzato si è invece utilizzata *Scenedesmus obliquus*, poiché l'idrolizzato in questione è stato ottenuto dalla *flash hydrolysis* di questa specie, e dunque è interessante valutare le potenzialità vere e proprie di riciclo tali da chiudere il ciclo produttivo. Anche *S.obliquus* è in ogni caso una specie spesso utilizzata per la sua alta velocità di crescita, capacità di fissare efficientemente la CO₂, e di crescere in acque reflue.

Per i preinoculi e le curve di crescita in batch sono state utilizzate bottiglie Drechsel di vetro da 250 mL, alimentate con una miscela gassosa di aria e CO₂ (5% v/v) con un flusso di 1 L/h ciascuna. La luce è fornita mediante delle lampade al neon, e i valori di irradianza sono misurati con un fotoradiometro (photo/radiometer, Delta OHM HD 2102.1). La miscela gassosa è fornita mediante un impianto, alimentato da bombole, in cui per mezzo di un sistema di regolazione è possibile alimentare alle bottiglie l'apporto desiderato di CO₂ e aria. Per evitare la sedimentazione delle cellule, la coltura è stata mantenuta in agitazione per mezzo di un'ancoretta magnetica.

Gli esperimenti in continuo sono stati eseguiti in un reattore di tipo *flat-panel* verticale, realizzato in policarbonato, con un volume di 128 mL e uno spessore di 1 cm. Il bubbling di CO₂ avviene mediante un tubo di silicone forato, posto sul fondo del reattore. Tale sistema favorisce

miscelazione, coadiuvata da un'ancoretta magnetica. Tale sistema è stato dimostrato approssimabile a un CSTR. Il sistema in continuo prevede un costante apporto di terreno di coltura e la rimozione di una eguale portata di biomassa prodotta dal reattore. Per l'alimentazione del terreno si utilizza una pompa peristaltica (Watson Marlow) con portata volumetrica regolabile, mentre l'uscita avviene tramite un "troppo pieno" che funge da controllo di livello (e di volume). La biomassa prodotta è raccolta in un serbatoio. Tutti i sistemi di coltivazione sono posti all'interno di un incubatore che garantisce la temperatura ottimale per l'alga scelta (28°C nel caso di *C. protothecoides* e 23°C per *S. obliquus*).

2.2 Terreni di coltura utilizzati

Il terreno utilizzato per le curve di controllo dei vari esperimenti condotti in batch è il BG11, modificato però in modo tale che l'azoto, a parità di concentrazione, fosse fornito come ammonio (NH₄Cl) invece che come nitrato (NaNO₃), poiché questa è la forma principale presente nei terreni di riciclo studiati. La composizione di tale terreno è espresso in tabella 2.1:

Tabella 2.1 composizione del BG11 terreno utilizzato per ottenere le curve di controllo

componenti	concentrazione	unità di misura
Na ₂ Mg EDTA	1.00E-03	g/L
Ferric ammonium citrate	6.00E-03	g/L
Citric acid . H ₂ O	6.00E-03	g/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	3.60E-02	g/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7.50E-02	g/L
K ₂ HPO ₄	30.5E-03	g/L
H ₃ BO ₃	2.86E-03	g/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.81E-03	g/L
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.222E-03	g/L
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.079E-03	g/L
COCl ₂ . 6H ₂ O	0.050E-03	g/L
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.391E-03	g/L
Na ₂ CO ₃	2.00E-02	g/L
Hepes 1M pH 8	1.00E-02	mM/L
NH ₄ Cl	0.943	g/L

Per gli esperimenti in continuo, esso è stato utilizzato in concentrazione doppia rispetto a quella presentata in tabella, con ulteriore eccesso di K_2HPO_4 (500 mg/L), in modo da garantire condizioni non limitanti.

Il digestato utilizzato in questo studio (i cui risultati sono presentati nel capitolo 3) è stato ottenuto dalla digestione anaerobica della biomassa microalgale residua in seguito all'estrazione della frazione lipidica (Elia Ramos Tercero 2014). La caratterizzazione è espressa in tabella 2.2

Tabella 2.2 *composizione elementare del digestato utilizzato*

Elementi	mg/L
N	616
P	3.884
Fe	0
Cu	0.005
Co	0.005
Mn	0.079
Zn	0.028
Na	43.67
Ca	51.8
K	37.82
Mg	32.74

L'idrolizzato impiegato per gli esperimenti con *S. obliquus* è stato ricevuto dalla Old Dominion University, Norfolk, VA (USA) sotto forma di polvere liofilizzata, avente la composizione riportata in Tabella 2.3. Esso è stato ottenuto dalla *flash hydrolysis* di *Scenedesmus* sp. in condizioni di temperatura e tempo di permanenza di 280°C e 9 secondi rispettivamente (Moscoso 2013). Tale polvere veniva dunque opportunamente disciolta in acqua bidistillata in modo da ottenere la concentrazione desiderata (come descritto successivamente nel capitolo 4).

Tabella 2.3 composizione elementare del dell'idrolizzato liofilizzato

Elementi	Idrolizzato liofilizzato 280°C (wt %)
S	0.14375
Ca	0.41
K	0.086805556
P	1.37
Fe	0.03
Zn	//
Mg	0.06
Cl	0.12
Mn	//
Si	0.03
Al	0.01
C	46.5
N	9.6
H	7.3

2.3 Metodi analitici per misurare la crescita delle cellule

2.3.1 Conta cellulare, velocità di crescita

La concentrazione cellulare è stata misurata usando una Counting Chamber Bürker (HBG, Germania) (Fig. 2.1 a sinistra). Essa consiste in un supporto largo 7.5x3.5 cm e profondo 4 mm. La camera è composta da due aree di 0,1 mm di profondità, ognuna delle quali contiene una rete di 9 grandi quadrati di lato 1 mm, divisi da una linea tripla. Ogni grande quadrato rappresenta un volume di 0,1 mL e contiene a sua volta 16 piccoli quadrati, suddivisi da linee doppie (Figura 2. a destra).

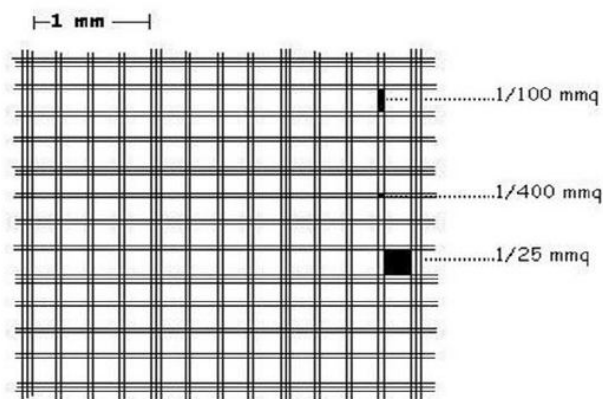
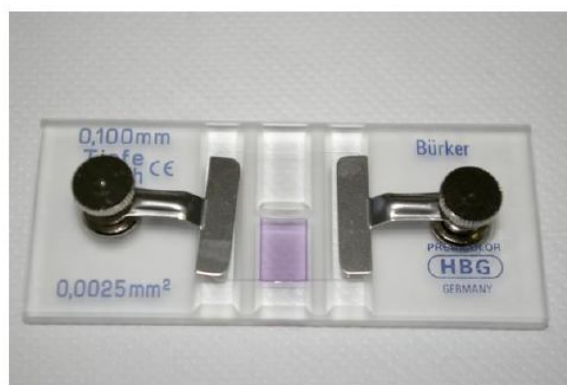


Figura 2. 1 Counting Chamber Bürker (a sinistra), uno dei 9 quadrati visibili al microscopio (a destra)

La conta cellulare è eseguita al microscopio ottico, dopo aver riempito le camerette con il campione opportunamente diluito. Dei 9 quadrati grandi vengono utilizzati per la conta solamente i 3 attraversati dalla diagonale, partendo da in alto a destra fino in basso a sinistra. Dopodiché si calcola il valore medio del numero di cellule contate..

La concentrazione cellulare è dunque calcolata come segue:

$$\text{concentrazione cellulare} \left(\frac{n^{\circ} \text{cell}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\sum \text{conta nei tre quadrati}}{3} \right) * \text{fattore di diluizione} * 10^4$$

(equazione 2.1)

dove 10^4 è dovuto al fatto che ciascun quadrato è caratterizzata da un volume di 0,1 μL .

La conta cellulare viene eseguita quotidianamente.

La velocità di crescita microalgale negli esperimenti in batch si ottiene graficando il logaritmo della conta cellulare in funzione del tempo. Essa infatti è pari al coefficiente angolare della retta che interpola i punti relativi alla fase di crescita esponenziale.

2.3.2 densità ottica OD

La densità ottica (Optical Density OD) della coltura è una misura indiretta della concentrazione. Essa viene misurata mediante uno spettrofotometro (Spectronic Unicam UV-500 UV-visibile, a doppio fascio). La misura è eseguita a una lunghezza d'onda fissa di 750 nm, in quanto questo valore è al di fuori del range di assorbimento dei pigmenti (clorofilla e carotenoidi) presenti nelle cellule, e l'attenuazione della luce è dovuta dunque unicamente a fenomeni di scattering. La procedura standard è la seguente:

1. "Il bianco"

Prima di eseguire la misura sul campione, lo spettrofotometro viene azzerato: si inseriscono due cuvette, da 1,5-2 ml ciascuna, riempite con il terreno di coltura, nel vano del campione da analizzare e a nel vano del riferimento dello spettrofotometro rispettivamente. .

2. L'assorbanza del campione

Dopo aver azzerato lo strumento con il terreno di coltura, lasciando la cuvetta del terreno nel posto del riferimento, si va ad inserire quella del campione che si vuole analizzare nel vano apposito, e se

ne misura l'assorbanza. , Poiché questa apparecchiatura funziona nell'intervallo assorbanza compreso tra 0,1 - 1, il campione viene diluito con il mezzo di coltura quando il limite superiore viene superato.

2.3.3 *Peso secco*

Il peso secco di biomassa microalgale rappresenta la quantità di microalghe essiccate per unità di volume, solitamente espresso in g/L. Tale misura viene eseguita quotidianamente nei sistemi continui, mentre nei sistemi batch viene effettuata a fine curva. Esiste una procedura standardizzata:

1. Viene raccolto un volume di 5 mL di campione di biomassa dal sistema di crescita
2. Un filtro per biomassa (Sartorius Stedim Biotech nitrocellulosa, dimensione dei pori 0,2 micron) viene posto in forno a 94 ° C per 10 minuti per rimuovere l'umidità assorbita, e quindi subito pesato con la microbilancia (Atilon Acculab Sartorius Group) che ha una sensibilità di 10⁻⁴ g. Tale peso rappresenta la tara della misura (*DW_t*);
3. Il campione di biomassa, a volume noto, viene filtrato per mezzo di una beuta da vuoto;
4. Il filtro viene posto in forno a 94 ° C per 2-4 ore per rimuovere l'acqua inter e intra cellulare;
5. Infine, dopo l'essiccamento, il filtro viene nuovamente pesato, e tale misura rappresenta il peso lordo (*DW_l*).

Il peso secco DW è dunque calcolato come:

$$DW = \frac{DW_l - DW_t}{\text{volume del campione}} \quad (\text{equazione 2.2})$$

Per gli esperimenti in continuo con l'idrolizzato, poiché esso stesso contiene delle sospensioni solide, il peso secco è stato calcolato come:

$$DW = DW_C - DW_{FH} \quad (\text{equazione 2.3})$$

dove con DW_C si indica il peso secco del campione algale e con DW_{FH} il peso secco del terreno alimentato (FH, flash hydrolysis).

2.4 metodi analitici per misurare i nutrienti

2.4.1 caratterizzazione del fosforo

La misura della concentrazione di ortofosfato (PO_4^{3-}) presente nel terreno di coltura viene fatta utilizzando il saggio colorimetrico dell'acido ascorbico (APHA-AWWA-WEF, 1992). Si prepara una miscela di acido solforico 5N, potassio antimonio tartrato, ammonio molibdato, e acido ascorbico. La miscela dei reagenti viene fatta reagire con il campione di cui si desidera caratterizzare il contenuto di PO_4^{3-} . Il meccanismo di reazione prevede la formazione di un complesso tra lo ione ortofosfato, l'ammonio molibdato e il potassio antimonio tartrato che sono presenti nel reagente. Il complesso che si forma viene ridotto dall'acido ascorbico, dando una colorazione blu, la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione di ioni PO_4^{3-} presenti. Il reagente deve essere utilizzato entro le (3-4 ore) dalla sua preparazione in quanto ha una stabilità limitata. Anche l'acido ascorbico andrebbe preparato lo stesso giorno d'utilizzo per via della sua accelerata degradazione. La miscela dei reagenti sopra indicati è preparata come specificato di seguito:

- **Acido Solforico 5 N:** preparato diluendo 35 ml di acido solforico 96% p/p in 250 ml di H_2O bidistillata
- **Potassio antimonio Tartrato:** 0.34 g di polvere in 250 ml di H_2O bidistillata
- **Ammonio molibdato:** 7.5 g di polvere in 250 ml di H_2O bidistillata
- **Acido ascorbico:** 1.35 g di polvere in 25 ml di H_2O bidistillata.

Le quantità di ciascuno di questi reagenti utilizzate per preparare una miscela di 5 mL è indicata nella tabella 2.5

Tabella 2.4 quantità di soluzione per ottenere 5 ml di reagente.

Soluzioni	Volumi (ml)
Acido solforico 5N	2.5
Potassio antimonio tartrato	0.5
Ammonio molibdato	1
Acido ascorbico	1

I campioni da analizzare devono essere opportunamente diluiti in modo che la concentrazione finale sia compresa tra 0.5 e 5 mg/L di ione ortofosfato (intervallo di sensibilità del saggio). Ciascun campione deve avere un volume finale di 2.5 mL e ad ogni campione vengono aggiunti 250 µL di reagente preparato come descritto. Il tempo di reazione è di 5 minuti e la lunghezza d'onda di lettura è $\lambda=705$ nm. Per determinare la concentrazione dei PO_4^{3-} è necessario possedere una retta di taratura (figura 2.2) costruita precedentemente misurando l'assorbanza di soluzioni a concentrazione nota di ione PO_4^{3-} . Dall'assorbanza letta sullo spettrofotometro e dall'equazione della retta di taratura è possibile determinare la concentrazione di ortofosfato come :

$$[\text{PO}_4^{3-}] = 14.578 * \text{Abs} (705 \text{ nm}) - 0.823 \quad R^2 = 0.9943 \quad (\text{equazione 2.4})$$

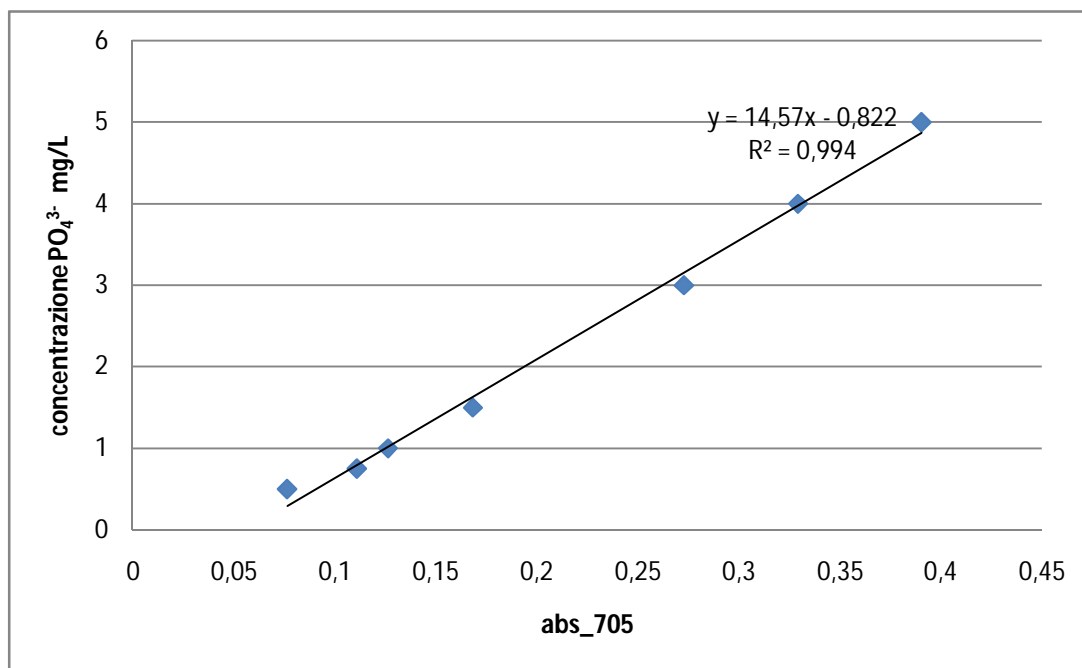


Figura 2.2 Retta di taratura costruita a concentrazioni note di fosfato, e misurata a 705 nm.

2.4.2 Caratterizzazione dell'azoto

2.4.2.1 Azoto ammoniacale

Il contenuto di azoto ammoniacale è stato misurato mediante il kit HYDROCHECK SPECTRATEST con reagenti predosati. Esso si basa su una reazione colorimetrica tra reattivo di Nessler (tetraiodomercurato di potassio) e ammoniaca, secondo la reazione descritta dall'equazione 2.5



Gli ioni ammonio presenti nel mezzo analizzato (in questo lavoro digestato e idrolizzato) vengono precedentemente convertiti in forma ammoniacca dagli idrossidi contenuti nei reagenti. Questa reazione porta ad un denso colore giallo/arancione. L'assorbanza del campione dovuta alla reazione colorimetrica viene misurata mediante lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 445 nm. Il campione precedentemente diluito deve avere un volume di reazione di 5 ml, e la misura dell'assorbanza può essere fatta dopo 5min. La retta di taratura (Figura 2.3) è stata determinata misurando l'assorbanza di soluzioni a concentrazioni di ammoniacca (NH₄Cl) conosciuta.

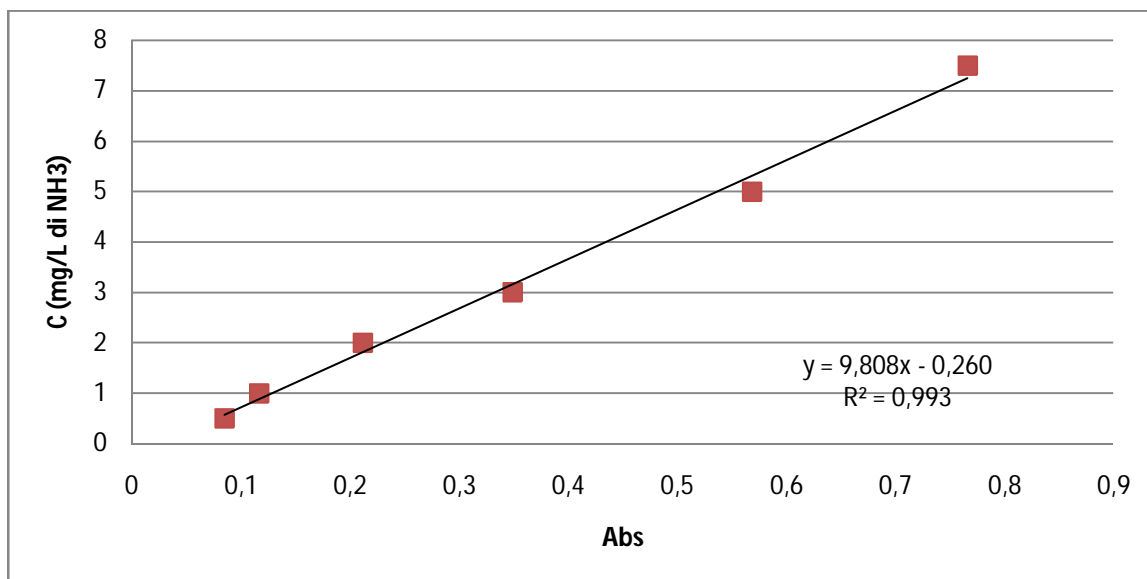


Figura 2.3 Retta di taratura dell'ammonio ottenuta con HYDROCHECK SPECTRATEST

La concentrazione dell'ammonio in mg/L è ottenuta dall'equazione seguente:

$$[NH_3] = 9.8089 * Abs(445 \text{ nm}) - 0.2607 \quad (R^2 = 0.9932) \quad (\text{Equazione 2.6})$$

2.4.2.2 Azoto totale

La misura dell'azoto totale è stata eseguita mediante il kit HYDROCHECK AZOTO TOTALE MONOTEST. La procedura prevede un iter lungo, impegnato dall'uso di più reagenti e passaggi, di seguito descritti. In sintesi, tutti i composti azotati (azoto organico, ammoniacca e nitriti) vengono dapprima ossidati a nitrati alla temperatura di 100 °C, e in seguito misurati in maniera colorimetrica sfruttando il 2,6-dimetilfenolo. La lunghezza d'onda alla quale deve essere condotta la misura è di

340 nm, mentre il campo di misura va da 0.20 a 6.0 ppm. La retta di taratura utilizzata figura 2.4 è stata costruita a concentrazioni note di N.

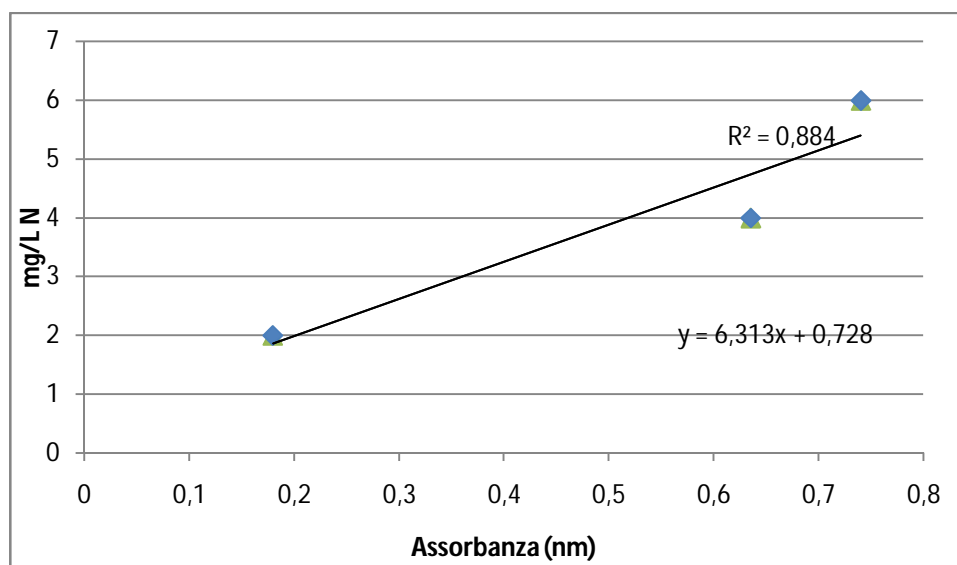


Figura 2.4 Retta di taratura dell'azoto totale misurato a 340nm, a concentrazione di azoto nota

La concentrazione di azoto è determinata dalla seguente equazione:

$$[N] = 6,313 * \text{Abs} (340 \text{ nm}) + 0,7285 \quad (\text{equazione 2.7})$$

2.4.3 caratterizzazione COD

La quantificazione del Chemical Oxygen Demand (COD) è stata misurata con un kit di determinazione Sigma COD (Sigma-Aldrich®). Questo metodo si basa sull'ossidazione di sostanze organiche e inorganiche per mezzo dello ione dicromato, la cui concentrazione è quantificata per via colorimetrica tramite uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 430 nm. La procedura prevede una reazione di 2 ore a una temperatura di 148°C. Possibili interferenze di ioni cloruro sono evitate grazie alla presenza di solfato di mercurio, mentre l'acido solforico funge da catalizzatore.

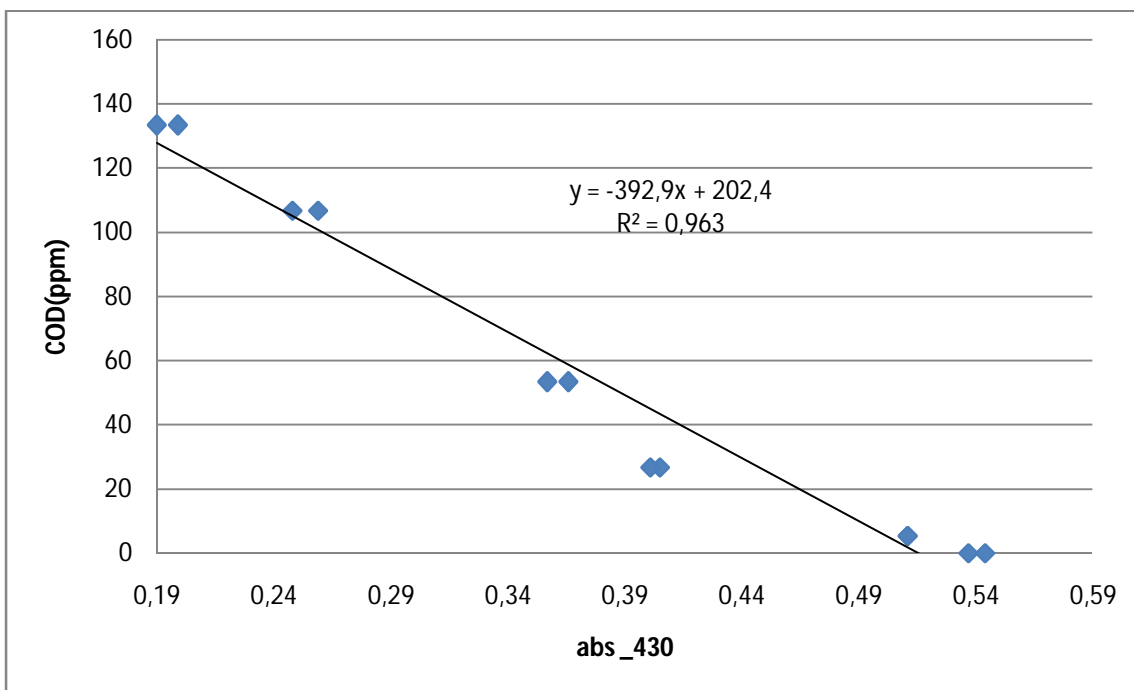


Figura 2.5 retta di taratura per la misurazione di COD, a 430 nm a concentrazioni note di **potassio, idrogeno ftalato**

La retta di calibrazione (Figura 2.5) è stata determinata con soluzioni a valore noto di COD, ottenute dosando glucosio in acqua bidistillata. La pendenza delle rette di calibrazione è opposta: infatti, il kit COD è realizzato con fiale contenenti potassio dicromato predosato; questo metodo misura la quantità di residua di dicromato nelle fiale dopo la reazione con sostanze organiche, mentre tutti gli altri metodi misurano la quantità di prodotti di reazione formati.

La concentrazione di COD viene calcolata dalla seguente equazione:

$$[\text{COD}] = -392,94 \cdot \text{Abs} (430 \text{ nm}) + 202,49 \quad R^2 = 0,9637 \quad (\text{Equazione 2.8})$$

Capitolo 3

Digestione anaerobica : Risultati

Nel capitolo seguente saranno esposti i risultati ottenuti relativamente alla crescita di *C. protothecoides* in un digestato, ottenuto da digestione anaerobica di microalghe. Si sono tenuti in considerazione diversi fattori, quali il pH, la sterilità, e la concentrazione dei nutrienti.

3.1 Curva di controllo

Dalle analisi condotte sul digestato si è visto che l'azoto è presente quasi esclusivamente in forma ammoniacale. Per tale motivo, come riferimento si è fatto crescere *Chlorella protothecoides* in BG11 modificato fornendo l'azoto sottoforma di cloruro d'ammonio invece che di nitrato, a parità di concentrazione (247 mg/L di N). Tutti gli altri nutrienti rispecchiano la composizione del BG11 riportata in tabella 2.1 (nel capitolo materiali e metodi). Per poter fare un confronto *Chlorella protothecoides* è stata coltivata anche in BG11 standard. La forma in cui è presente l'azoto è dunque l'unica differenza tra i due terreni appena introdotti. Mentre rimangono identiche le concentrazioni di nutrienti e micronutrienti e condizioni di lavoro. Le condizioni sperimentali utilizzate sono riassunte in tabella 3.1. Le curve di crescita sono state condotte in bottiglie Drechsel, con un volume di coltura di 100 ml, in condizione di sterilità. In figura 3.1 vengono riportate le curve di crescita dei controlli utilizzando i terreni sopra descritti.

Tabella 1.1 condizioni di lavoro adottate nella coltura con BG11
3 BG11 modificato con cloruro d'ammonio

Condizioni di lavoro	
Temperatura	23°C
Illuminazione	120 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$
CO ₂ alimentata	5% in vol

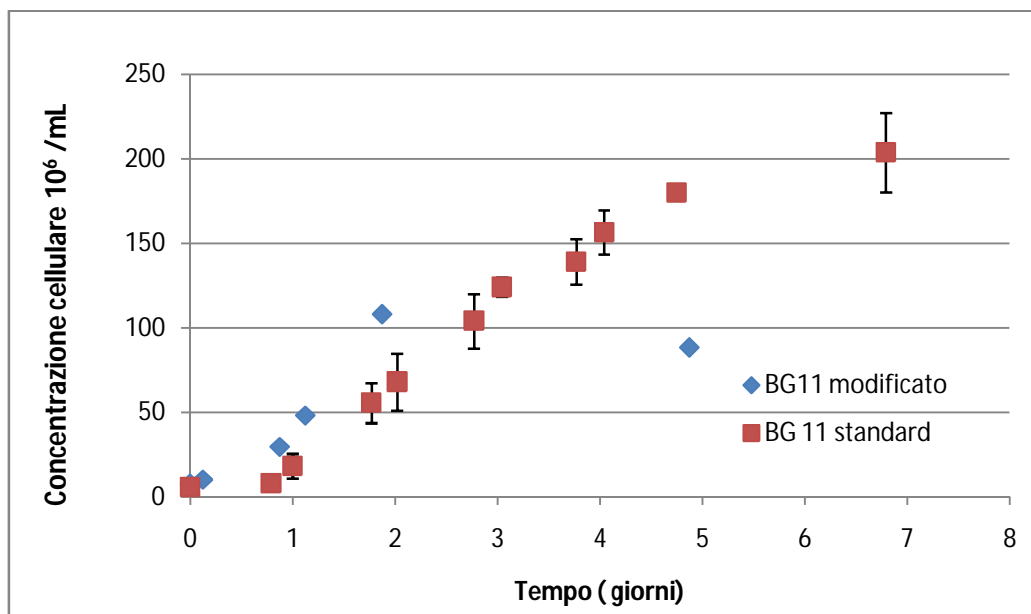


Fig. 3.1 Curva di crescita di *Chlorella protothecoides* in BG 11 e BG 11 modificato con cloruro d'ammonio.

La velocità di crescita ottenuta in queste condizioni risulta essere 1.56 d^{-1} , mentre la concentrazione di biomassa finale è pari a $1.7 \text{ g/L} \pm 0.0283 \%$. Nel caso del BG11 standard (a base di nitrato di azoto) la velocità di crescita e il peso secco finale risultano essere rispettivamente 1.68 d^{-1} e $1.39 \text{ g/L} (\pm 0.0872)$. Si nota che in quest'ultimo caso la concentrazione cellulare finale è maggiore rispetto a quella ottenuta con BG11 modificato, nel quale la crescita pare arrestarsi dopo qualche giorno. Tutto ciò può essere spiegato dal fatto che il pH, monitorato durante la crescita è diminuito da un valore di 7 durante i primi giorni, a un valore di 3. Ciò potrebbe aver causato un arresto della riproduzione cellulare, parallelamente ad un aumento delle dimensioni delle cellule stesse, come confermato dall'elevato valore di peso secco (1.7 g/L). Il consumo di azoto e di fosforo è stato calcolato rispettivamente come:

$$Y_N = \left[\frac{N_i - N_f}{N_i} \right] * 100 ; \quad (\text{Equazione 3.1}) \quad Y_P = \left[\frac{P_i - P_f}{P_i} \right] * 100 ; \quad (\text{Equazione 3.2})$$

dove N_i e P_i rappresentano l'azoto e il fosforo iniziali mentre N_f e P_f i medesimi nutrienti misurati a fine curva, i valori di Y_N , Y_P sono riportati in figura 3.2

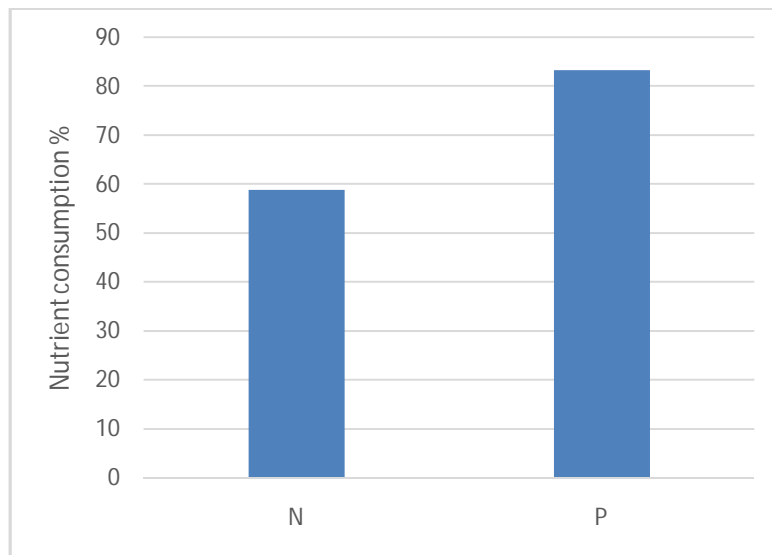


Figura 3.2 Consumo dei nutrienti relativo alla crescita di *Chlorella protothecoides* in BG11 modificato con cloruro d'ammonio.

Il consumo in percentuale dell'azoto e del fosforo risultano essere del 59% e 83% rispettivamente.

3.2 *C. protothecoides* cresciuta nel digestato

3.2.1 Crescita nel digestato

Poiché il digestato, utilizzato presenta una concentrazione di azoto pari a 542 mg/L (sotto forma di ammonio) esso è stato diluito in modo tale da ottenere una concentrazione di 247mg/L, pari a quella del terreno utilizzato nella curva di controllo, considerata quindi come riferimento per confrontare i parametri di crescita. Di conseguenza, anche la concentrazione di fosforo (pari a 1.253 mg/L) e di tutti i micronutrienti presenti risulta diluita dello stesso fattore. L'assorbimento del digestato a 750 λ risultava essere 0.038 dopo diluizione. Le condizioni sperimentali utilizzate sono le medesime del controllo. In figura 3.3 sono riportate la curva di crescita ottenuta utilizzando il digestato diluito e quella di controllo. Dal confronto si vede chiaramente che la crescita nel digestato, sebbene segua inizialmente quella del controllo si arresta a valori molto inferiori di concentrazione cellulare.

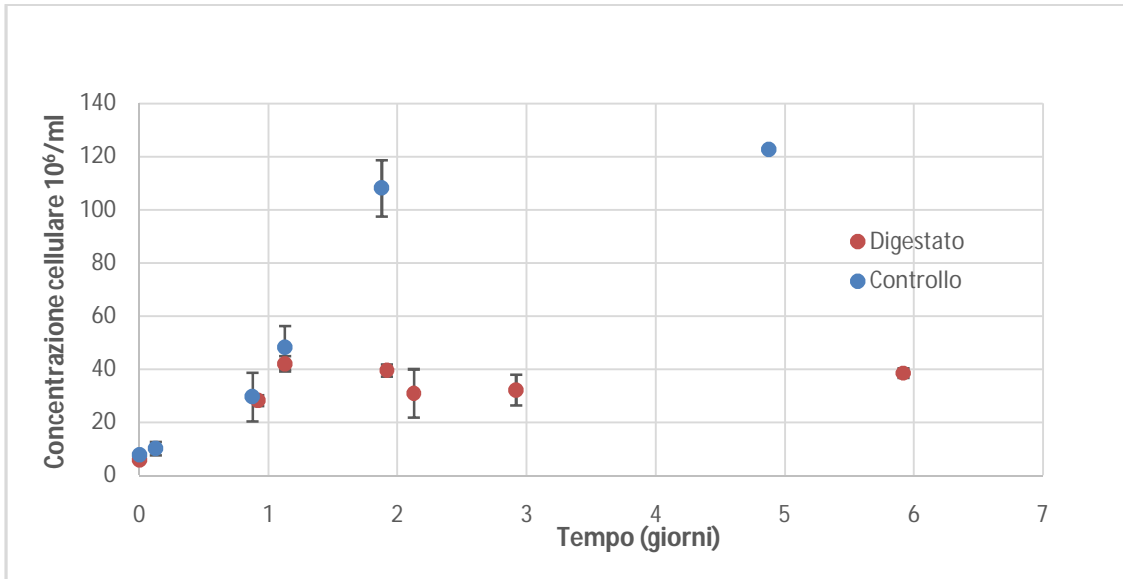


Figura 3.3 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides* nel digestato (rosso) e di controllo (blu)

La velocità di crescita iniziale infatti è elevata, pari a 1.74 d^{-1} , mentre il peso secco ottenuto è di 0.4 g/L . Dalle analisi relative al consumo di nutrienti si è osservato che il fosforo è interamente consumato, mentre l'azoto si riduce solo del 16%. Inoltre dall'andamento giornaliero delle concentrazioni di nutrienti (figura 3.4), si osserva che dopo circa 20 ore il fosforo disponibile nel terreno è già stato interamente consumato. Si è dunque inizialmente ipotizzato che l'arresto della crescita potesse essere causato dalla limitazione di tale nutriente. Per verificare tale ipotesi, si è proseguito come descritto nel prossimo paragrafo.

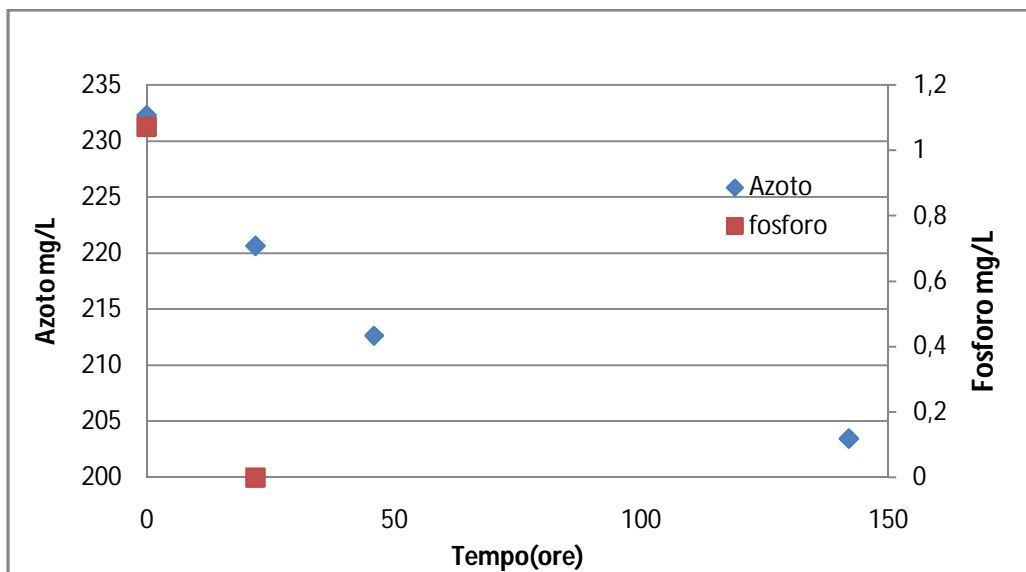


Figura 3.4 andamento giornaliero di azoto e fosforo nel digestato

3.2.1 Crescita nel digestato con il giusto apporto di fosforo

Nell'esperimento che segue sono state riprodotte le condizioni sperimentali precedenti, aggiungendo inoltre una quantità di K_2HPO_4 tale da raggiungere la concentrazione di fosforo del BG11, pari a 5.4 mg/L. Tuttavia in tali condizioni la crescita microalgale non è migliorata, come si vede da figura 3.5. Dunque si è ripetuto l'esperimento con le stesse concentrazioni di nutrienti, ma in condizioni di sterilità, autoclavando il digestato per 20 min a 121 °C. La crescita risulta essere in questo caso addirittura inferiore rispetto a quelli precedenti.

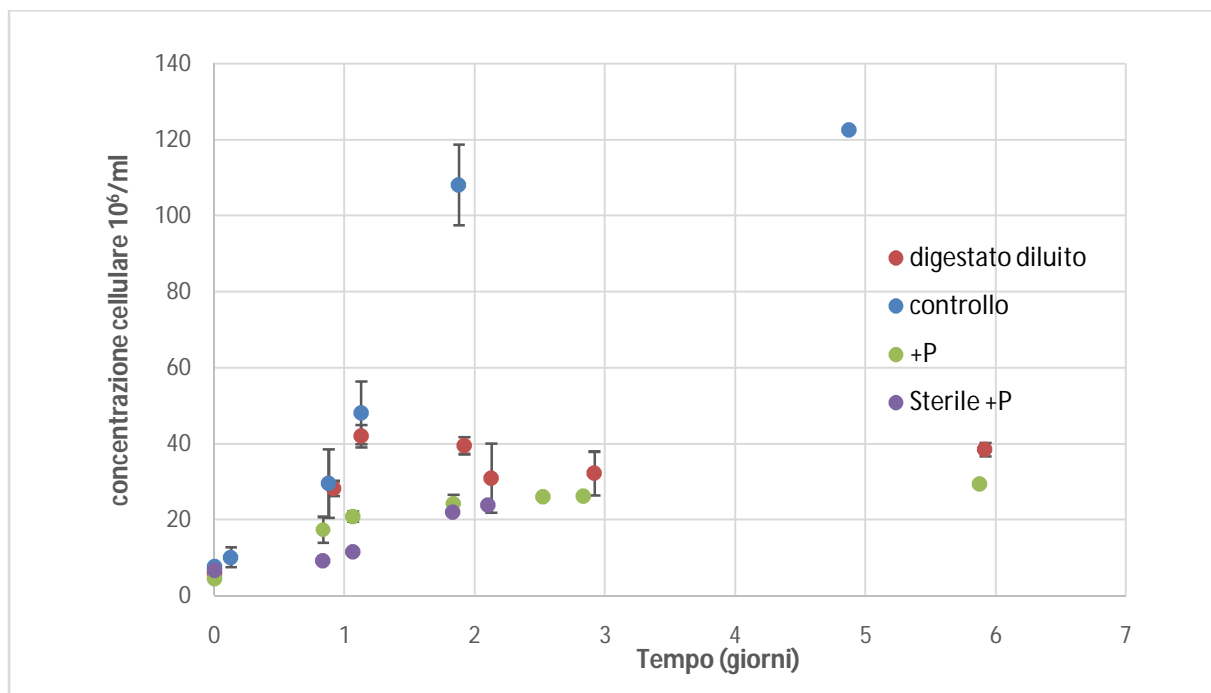


Figura 3.3 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides*: nel digestato (rosso) e di controllo (blu), nel digestato con aggiunta di fosforo (verde), nel digestato con aggiunta di fosforo e autoclavando (viola)

Pertanto né la mancanza di fosforo né la presenza di contaminazione sono sufficienti a giustificare l'arresto della crescita. L'aggiunta di fosforo porta in entrambi i casi a valori di parametri di crescita minori rispetto a quelli ottenuti con il controllo e con il digestato diluito. In tabella 3.2 sono riassunti i risultati degli esperimenti descritti: si vede come il peso secco nonostante l'aggiunta di fosforo e condizioni di sterilità, sia circa 7 volte inferiore al controllo, e che anche la velocità di crescita risulta più bassa.

Tabella 3.2 risultati in termini di velocità di crescita, peso secco, consumo di nutrienti per le diverse condizioni sperimentate.

Esperimento	Velocità di crescita d ⁻¹	peso secco g/L	Y _N %	Y _P %
controllo	1.56	1.7	59	83
digestato diluito	1.74	0.4	16	100
aggiunta di P	1.5	0.28	51	56
aggiunta di P e sterilità	0.86	0.25	21	100

3.2.3 Crescita nel digestato ,effetto del PH

Come già ricordato il digestato è ricco in azoto ammoniacale. A secondo del valore del pH, l'equilibrio tra NH₃ e NH₄⁺ varia. In particolare per valori alcalini l'equilibrio favorisce più alte concentrazioni di NH₃. Quest'ultima risulta essere inibente per la crescita microalgale, manifestando un effetto di tossicità già a concentrazioni relativamente basse (2mM) (Mankou 2014). In base al valore di pK dell'equilibrio (9.15 a 28°C), affinché la concentrazione di ammoniaca libera sia inferiore a quella riconosciuta tossica il pH della soluzione deve essere mantenuto inferiore a 7.5. A fronte di questa considerazione, l'esperimento successivo è stato condotto nelle medesime condizioni dei precedenti (con l'aggiunta di fosforo, non in sterilità) ma controllando manualmente, tramite l'aggiunta di acido cloridrico (HCl), il pH intorno ad un valore di 7. In tale modo inoltre secondo quanto riportato in letteratura aumenta anche l'accessibilità da parte delle microalghe del fosforo, il quale per pH troppo basici potrebbe depositarsi con il calcio (Markou 2014)

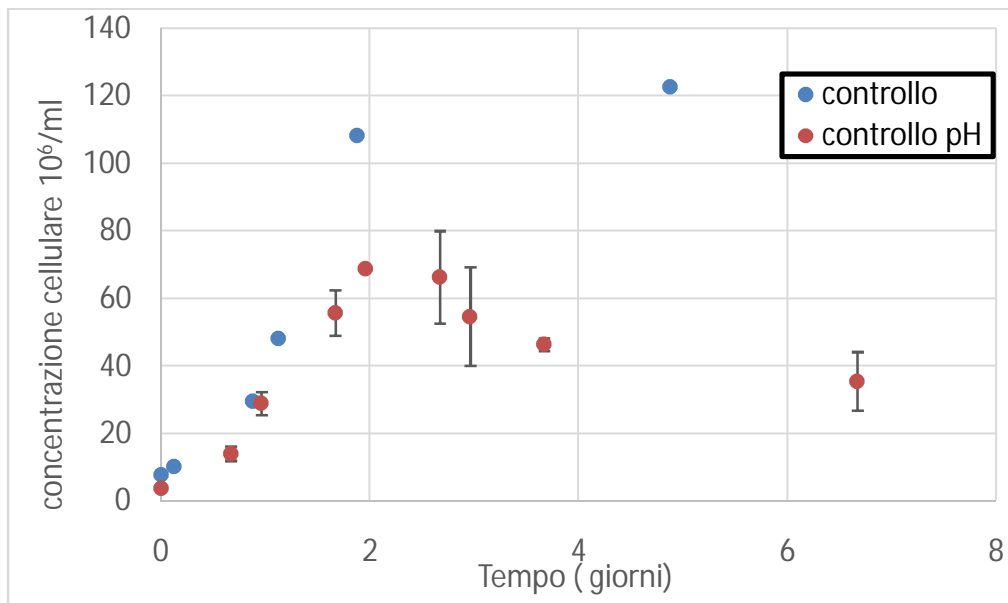


Figura 3.6 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides*: nel digestato con controllo di pH (rosso) e di controllo (blu)

Dalla curva di crescita ottenuta (figura 3.6) si è notato un leggero miglioramento rispetto agli esperimenti visti nel precedente paragrafo, in termini sia di velocità di crescita sia di concentrazione finale di biomassa le quali risultano essere rispettivamente 1.48 d^{-1} e 0.41 g/L . Il controllo del pH si è dimostrato necessario per la crescita microalgale nel digestato ma non sufficiente per raggiungere parametri di crescita confrontabili con quelli del controllo. In fine il consumo dei nutrienti in questo caso è stato del 26 % per l'azoto e 76 % per il fosforo.

3.3 Crescita nel digestato con apporto di micronutrienti e analisi elementare del digestato

A valle delle considerazioni fatte precedentemente, si è ipotizzato che l'arresto della crescita possa essere dovuto ad una carenza, nel digestato, dei vari micronutrienti (K, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B) necessari alle microalghe, e finora non presi in considerazione. Pertanto si è proseguito con un esperimento nelle stesse condizioni sperimentali dei precedenti, controllando il pH al valore di 7, e con l'aggiunta nel digestato di tutti i micronutrienti nelle stesse concentrazioni presenti nel terreno di riferimento BG11 (vedi capitolo 2). La curva di crescita risultante da questo esperimento, confrontata con quella ottenuta con il terreno di controllo è presentata nel grafico di figura 3.7

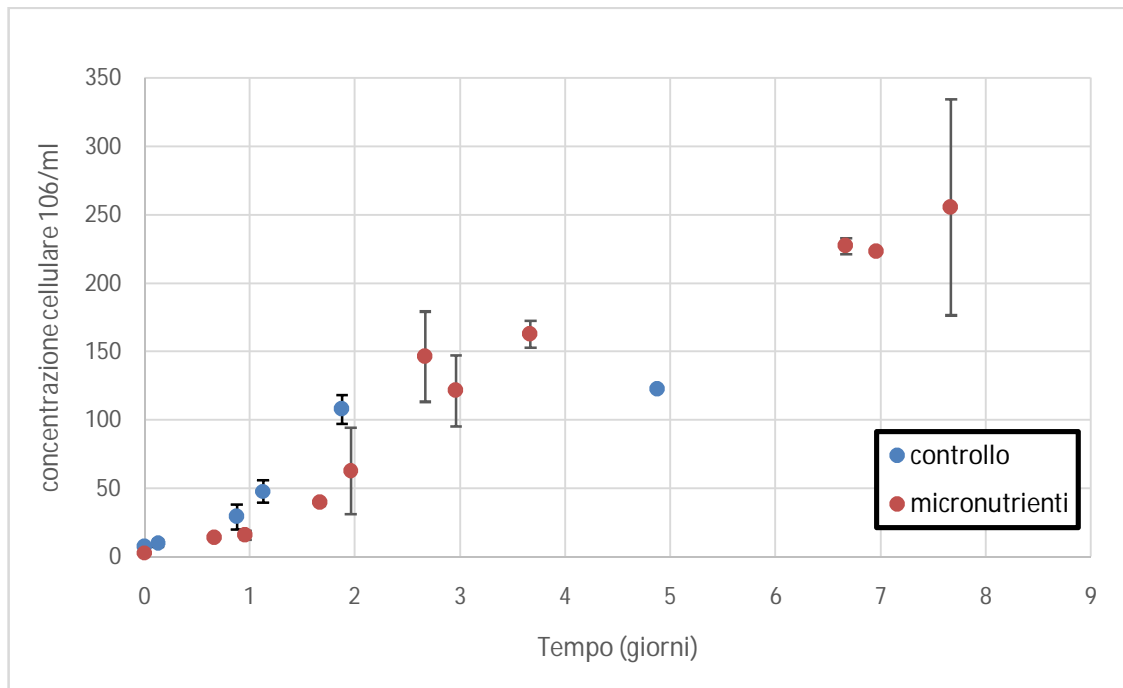


Figura 3.7 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides*: nel digestato con l'aggiunta di tutti i micronutrienti (rosso) e di controllo (blu)

La curva di crescita ottenuta con l'aggiunta di micronutrienti supera in concentrazione cellulare quella ottenuta con il controllo, probabilmente a causa delle considerazioni sul pH fatte nel § 3.1. I valori della velocità di crescita e concentrazione di biomassa finale rimangono leggermente inferiori a quelli ottenuti nel controllo: infatti si ha 1.37d^{-1} rispetto a 1.56d^{-1} del controllo per la velocità di crescita, mentre risulta essere 1.39 g/L contro 1.7 g/L del controllo, il peso secco. I consumi dei nutrienti misurati risultano pari a 80% per l'azoto ed a 100% per il fosforo. In seguito si è condotta un'analisi elementare sul digestato per determinare l'effettiva concentrazione dei vari micronutrienti presenti in esso. Tali valori sono stati confrontati con quelli del terreno di coltura usato per il controllo (BG11) con lo scopo di verificare quali micronutrienti nel digestato fossero più carenti, e potessero dunque essere limitanti per la crescita delle microalghe. Dall'analisi elementare è emerso che il digestato è carente di numerosi micronutrienti: K e Mg risultano gli unici con concentrazione superiore rispetto a quella del BG11, mentre gli altri elementi sono presenti in concentrazioni molto basse, o assenti, come il ferro e lo zolfo, entrambi essenziali per la crescita microalgale. Nella tabella 3.2 è riportata la composizione del digestato una volta diluito e del terreno di riferimento. Nella colonna di destra è riportata la differenza tra le concentrazioni del terreno di controllo e quella del digestato.

Tabella 3.2 Analisi elementare dei micronutrienti presenti nel digestato, nel BG11, e la differenza tra le concentrazioni del terreno di controllo e quella del digestato.

Micronutriente	Digestato diluito (mg/L)	BG11 (mg/L)	Δ BG11-digestato(mg/L)
N	247	247	0
K	15.165	6.854	-8.311
Mg	13.128	7.398	-5.730
Fe	0	1.279	1.279
Zn	0.011	0.051	0.039
Mn	0.032	0.503	0.471
Cu	0.002	0.020	0.018
Co	0.002	0.012	0.010
S	0	9.798	9.798

In grassetto è evidenziato, il quantitativo, in termini di concentrazioni, presente nel terreno di riferimento rispetto al digestato. Negli esperimenti che seguono si è approfondito l'influenza dei vari micronutrienti ai fini della crescita. Per quanto concerne lo zolfo si precisa che il valore indicato (9.798 mg/L) nel BG11 è presente come ione solfato SO_4^{2-} , che è l'unica forma assimilabile dalle microalghe, esso in particolare viene fornito come $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (il quale contribuisce per l'apporto dello zolfo per il 99.64%) , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (per lo 0.253%) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (per lo 0.104%).

3.3.1. crescita nel digestato con apporto di solo ferro

Come primo tentativo si è aggiunto al digestato solamente il Fe (sotto forma di sale $\text{FeCl}_3 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$), in quantità pari alla concentrazione del BG11, poiché questo elemento, considerato uno dei più essenziali per le microalghe (Markou 2014) è risultato completamente assente, a differenza degli altri metalli. Il digestato così ottenuto è stato dunque utilizzato come terreno di coltura per *C. protothecoides*. Le altre condizioni di lavoro sono identiche a quelle degli esperimenti precedenti, con concentrazioni di azoto e fosforo rispettivamente 247 mg/L e 5.4 mg/L a 28°C, 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$, 5% di CO_2 , in assenza sterilità e con controllo di pH.

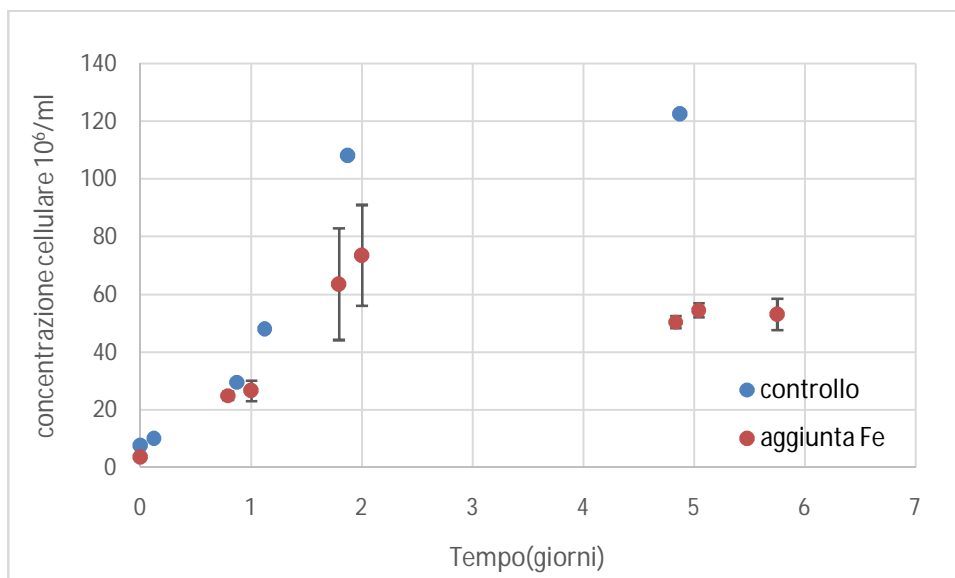


Figura 3.8 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides*: nel digestato con l'aggiunta di solo Fe (rosso) e di controllo (blu)

Dal grafico di figura 3.8 si vede come la curva di crescita ottenuta con l'aggiunta di solo ferro stia al di sotto di quella del controllo, diversamente da quella ottenuta con l'aggiunta di tutti i micronutrienti (vedi figura 3.7). Da ciò si deduce che il ferro non sia l'unico micronutriente necessario ad ottenere la crescita osservata nel caso dell'esperimento descritto nel paragrafo 3.3. La velocità di crescita risultante in queste condizioni, è in ogni caso pari a $1.41 d^{-1}$, mentre la concentrazione finale di biomassa è risultata $0.4 g/L$, similmente a quanto ottenuto con il solo controllo del pH § 3.2.3. Il consumo dei nutrienti è circa il 14% per l'azoto e 68% per il fosforo. L'esperimento è stato inoltre ripetuto in condizioni di sterilità, ciò tuttavia non ha portato alcun miglioramento.

3.3.2 Crescita nel digestato con apporto di Fe, Zn, Cu

Dall'analisi elementare del digestato oltre al ferro, anche lo zinco e il rame risultano essere presenti in quantità molto minori rispetto al terreno di riferimento. Pertanto, come tentativo successivo al digestato sono stati aggiunti questi tre micronutrienti, in quantità pari alla differenza tra le concentrazioni già presenti in esso e quelle del BG11 (vedi tabella 3.2). Essi sono forniti come $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e $FeCl_3 \cdot (6H_2O)$. La curva di crescita ottenuta mostra con il digestato così modificato è riportato in figura 3.9. Essa mostra addirittura un andamento peggiore rispetto al caso precedente, dimostrando che nemmeno Zn e Cu rappresentano i micronutrienti limitanti.

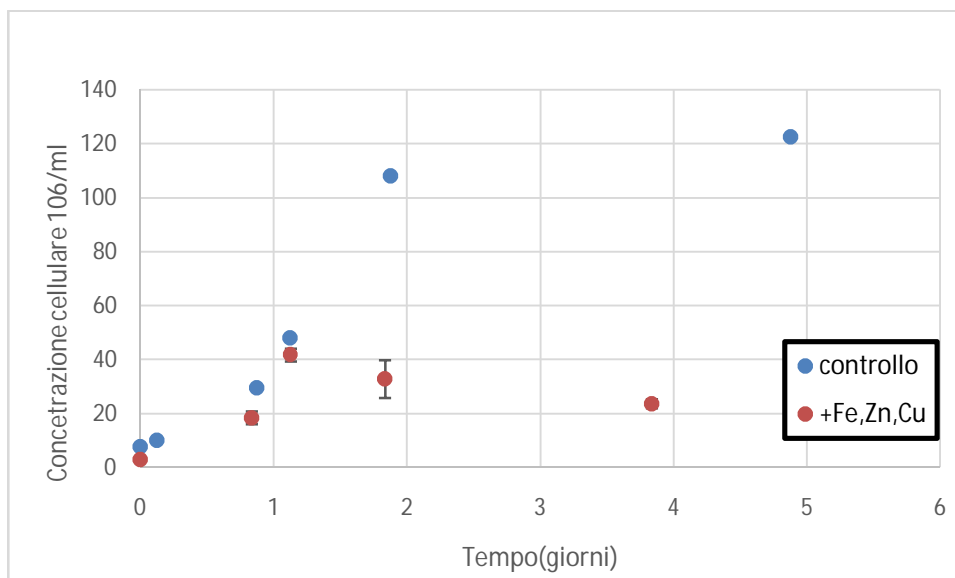


Figura 3.9 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides*: nel digestato con l'aggiunta di solo Fe, Zn, Cu (rosso) e di controllo (blu)

La velocità di crescita iniziale è ancora una volta pari a 1.41 d^{-1} , mentre il consumo dei nutrienti è circa 16% per l'azoto e 100% per il fosforo.

3.3.3 Crescita nel digestato con apporto di solfato di magnesio

Come ulteriore tentativo si è aggiunto al digestato diluito solamente lo zolfo sotto forma di $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, mantenendo invariate tutte le condizioni sperimentali. La curva di crescita ottenuta in queste condizioni è riportata in figura 3.10. In questo caso i parametri di crescita riassunti in tabella 3.3 sono risultati superiori a quelli del controllo e a quelli ottenuti con l'aggiunta di tutti i micronutrienti.

Tabelle 3.3 Confronto tra i risultati del controllo e quelli del digestato con l'aggiunta di tutti i micronutrienti e con l'aggiunta del solo $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$.

Esperimento	Velocità di crescita d^{-1}	peso secco finale g/L	Y_N %	Y_P %
controllo	1,56	1,7	59	83
aggiunta di tutti i micronutrienti	1,37	1,39	80	100
Aggiunta di $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	2	2,23	47	97

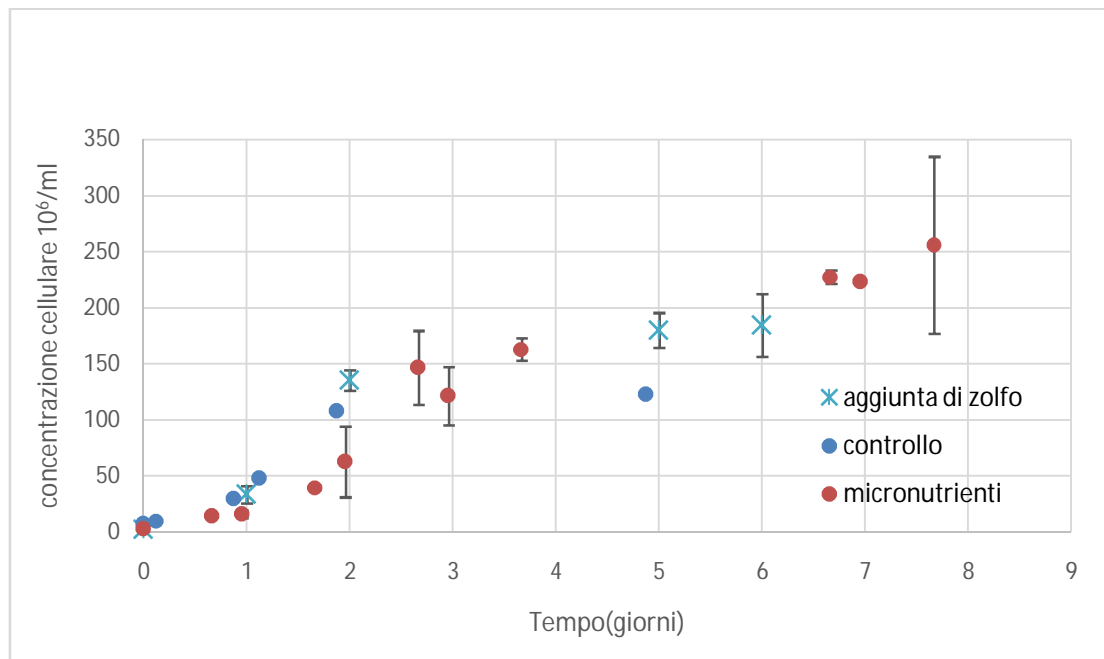


Figura 3.10 Curve di crescita di *Chlorella protothecoides*: nel digestato con l'aggiunta di tutti i micronutrienti (rosso) e di controllo (blu), nel digestato con l'aggiunta di $MgSO_4(7H_2O)$

3.4 Considerazioni conclusive

Dai risultati ottenuti nelle prove condotte si è visto che la coltivazione di *Chlorella protothecoides* in un digestato ottenuto da digestione anaerobica di microalghe è possibile, sebbene con alcuni accorgimenti. Infatti la microalga si è dimostrata capace di utilizzare l'ammonio presente nel digestato come fonte di azoto. Tuttavia si è reso necessario correggere il fosforo presente nel digestato per portarlo ad una concentrazione di 5.4 mg/L, non limitante per la crescita. Altro fattore che si è rivelato determinante ai fini di evitare affetti di tossicità da parte dell'ammoniaca è il controllo del pH (il quale negli esperimenti è stato operato in modo manuale), mentre la sterilità apparentemente non è rilevante. Ciò che però risulta necessario per la crescita sensibile e paragonabile a quella ottenuta con terreni standard è l'aggiunta di determinati micronutrienti. In particolare, in questo lavoro si è visto che lo zolfo e in particolare lo ione SO_4^{2-} , porta ad una crescita significativa delle microalghe. In tabella 3.4 vengono riassunti tutti gli esperimenti svolti.

Tabella 3.4 riassunto di tutti gli esperimenti svolti con i rispettivi risultati.

Esperimento	Velocità di crescita d⁻¹	peso secco g/L	Y_N %	Y_P %
controllo	1.56	1.7	59	83
digestato diluito	1.74	0.4	16	100
aggiunta di P	1.5	0.28	51	56
aggiunta di P e sterilità	0.86	0.25	21	100
controllo pH	1.48	0.4	26	76
aggiunta micronutrienti	1.37	1.39	80	100
aggiunta di Fe	1.41	0.4	14	68
aggiunta di Fe,Zn, Cu	1.41		16	100
aggiunta solfato di magnesio	2	2.23	47	97

Capitolo 4

Flash hydrolysis: risultati

In questo capitolo sono esposti i risultati ottenuti utilizzando come terreno di coltura l'idrolizzato prodotto da *flash hydrolysis*. In prima analisi sono stati condotti esperimenti in batch, in modo da determinare le potenzialità di crescita di *Scenedesmus obliquus* su tale substrato. Nel secondo paragrafo invece si considera un sistema continuo, nel quale si è studiato l'effetto dapprima della concentrazione di nutrienti in ingresso, e in un secondo momento del tempo di permanenza, sulla produttività.

4.1 Esperimenti in Batch

4.1.1 Crescita in presenza di anidride carbonica

4.1.1.1 Illuminazione continua

Come prima condizione, si è studiata la crescita di *Scenedesmus obliquus* nell'idrolizzato (le cui caratteristiche sono esposte nel §2.2) posta a gorgogliamenti di aria arricchita di anidride carbonica (5% vol.), e illuminazione continua. L'idrolizzato in polvere è stato sciolto in modo che la concentrazione di N iniziale fosse pari a quella del BG11 usato come controllo (247 mg L^{-1} , corrispondente a 34 mg L^{-1} di P). L'esperimento è stato eseguito in doppio. Le condizioni di lavoro sono sintetizzate nella tabella 4.1.

Tabella 4.1 condizioni di lavoro

Condizioni di lavoro	
CO ₂	5% in vol.
Terreno di coltura	idrolizzato
illuminazione	120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$
volume di reazione	100 ml
temperatura	23°C
concentrazione di N iniziale	247 mg/L
Concentrazione di P iniziale	34 mg/L

La curva di crescita ottenuta è riportata in figura 4.1, e la velocità di crescita calcolata risulta essere pari a 1.050 d^{-1} . Parallelamente, come controllo, si è fatta crescere la stessa microalga in BG11 (§2.2). Le microalge in questo terreno possono crescere soltanto attraverso una via fototrofa, sfruttando quindi luce e CO₂. La velocità di crescita di quest'ultimo è pari a 0.499 d^{-1} . Sebbene la concentrazione finale di cellule raggiunta sia simile nei due casi, la velocità di crescita ottenuta con l'idrolizzato è circa il doppio rispetto al controllo

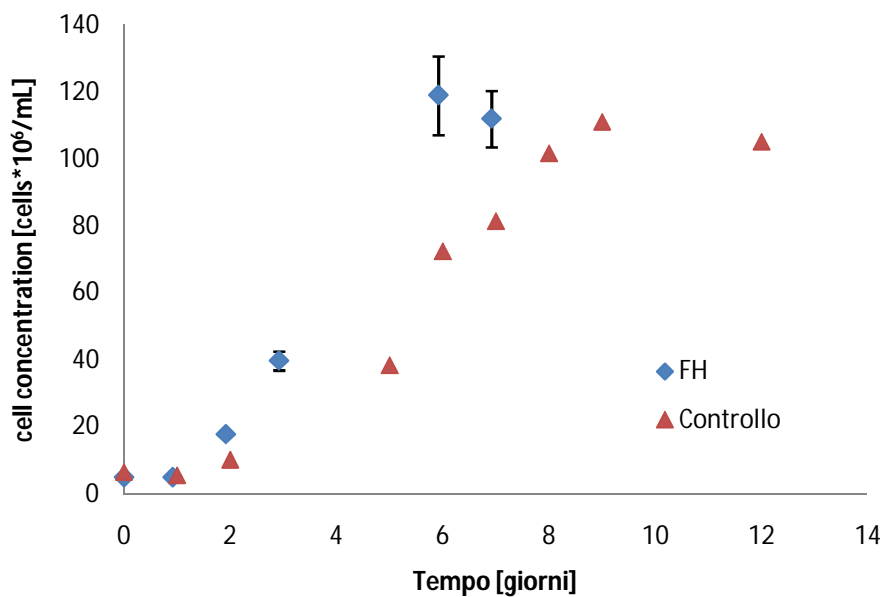


Figura 4.1 confronto tra le curve di crescita di *S. obliquus* su idrolizzato e su BG11(controllo), ottenute con bubbling di CO₂ e illuminazione continua.

I consumi di nutrienti relativi alla crescita nell'idrolizzato sono riportati in Figura 4.2. In particolare, il consumo di azoto (inteso come azoto totale, TN) è pari al 43.26% , mentre il fosforo, nonostante l'elevata concentrazione presente rispetto al BG11 (34 mg L⁻¹ invece di 5.4 mg L⁻¹), è stato consumato quasi interamente (98.83%). Inoltre, l'analisi del Chemical Oxygen Demand (COD), ha indicato un consumo del 19.16%: questo consumo di carbonio organico, che si riflette anche nella discreta percentuale di consumo dell'azoto (presente principalmente sotto forma di amminoacidi e peptidi), fa ipotizzare una crescita mixotrofa, in cui il contributo energetico necessario alle microalghe non deriva solamente dalla luce, ma anche dal substrato organico. Questo potrebbe giustificare l'elevata velocità di crescita rispetto al controllo.

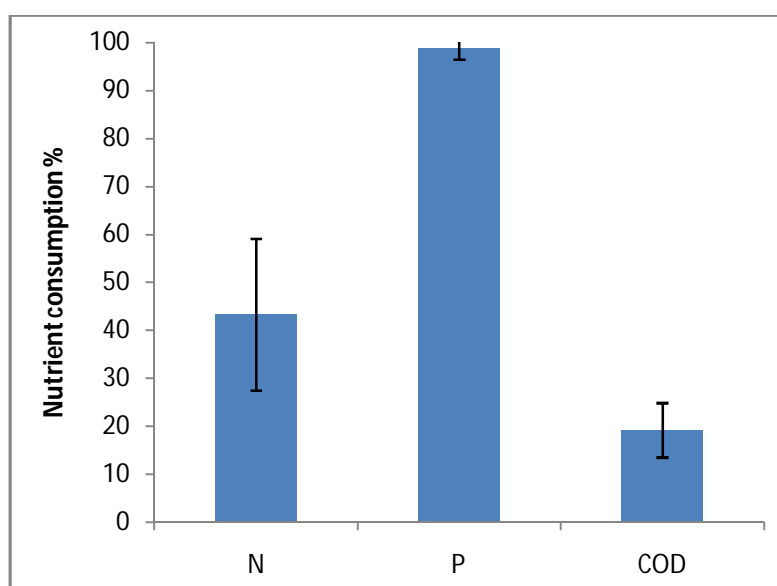


Figura 4.2 Consumi percentuali di azoto (TN), fosforo e COD

4.1.2.1 Illuminazione alternata (12 ore)

Il successivo esperimento è stato condotto sempre con gorgogliamenti di aria arricchita di anidride carbonica, ma questa volta in condizioni di luce discontinua, con intervalli di 12 h di luce costante (120 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) seguiti da 12 h di buio. Le concentrazioni di nutrienti sono le stesse dell'esperimento precedente. Anche in questo caso si sono eseguite due repliche biologiche dell'esperimento e parallelamente, come controllo, si è misurata la crescita di *Scenedesmus obliquus* in BG11 in cui l'azoto è fornito come ione ammonio (NH_4Cl). La scelta delle condizioni d'illuminazione descritte è utile per verificare se le microalghe nell'idrolizzato siano in grado di crescere comunque nelle ore di buio, non sfruttando quindi un metabolismo esclusivamente autotrofo, come invece avviene nel terreno di controllo, ma anche eterotrofo. Le condizioni di

lavoro sono riassunte nella tabella 4.2, dove con illuminazione 12B/12L si indicano indicare 12 ore di buio e 12 di luce.

Tabella 4.2 condizioni di lavoro adottate

Condizioni di lavoro	
CO ₂	5% in vol.
Illuminazione	120 μmol/(m ² s) 12B/12L
Volume di reazione	100 ml
Temperatura	23°C
BG11/controllo	N 247 mg/L
	P 5.4 mg/L
Idrolizzato	N 247 mg/L
	P 34 mg/L

Le curve di crescita ottenute con i due diversi terreni sono riportate in figura 4.3, insieme a quella relativa all'esperimento precedente (con luce continua).

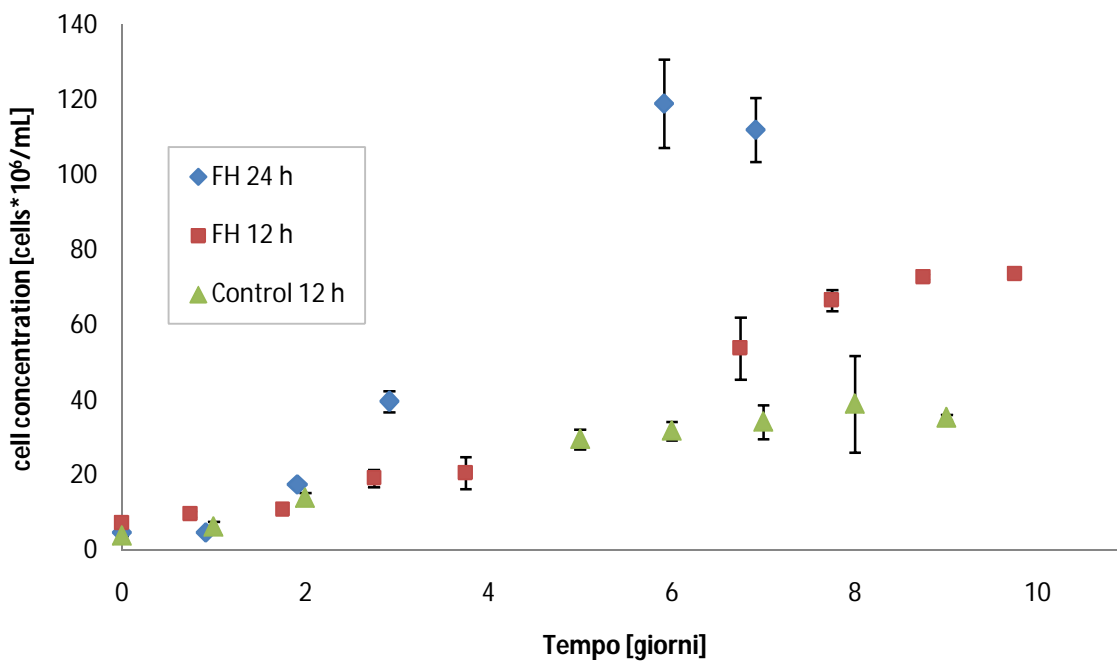


Figura 4.3 curve di crescita di *S. obliquus* cresciuta nell'idrolizzato (rosso) e nel BG11 (verde) in condizioni di illuminazione alternata, e nell'idrolizzato con luce continua (blu). FH 12h (che sta per flash hydrolysis 12 ore di luce continua e 12 di buio)

Si vede chiaramente come in condizione di luce continua le microalghe raggiungano una concentrazione cellulare maggiore rispetto agli esperimenti condotti a luce dimezzata. Inoltre si nota come a parità di illuminazione (12 ore di buio e 12 ore di luce) sebbene le velocità di crescita siano molto simili (tabella 4.3), l'idrolizzato consente di raggiungere a valori maggiori di concentrazione rispetto a quella ottenuta su BG11. I risultati in termini di velocità di crescita e consumo dei nutrienti relativi ai tre casi, sono riassunti in tabella 4.3. Per quanto riguarda l'idrolizzato, è stato misurato sia il consumo di azoto totale (indicato in tabella come $\Delta\text{TN}/\text{TN}_i$), sia quello di azoto ammoniacale (indicato in tabella $\Delta\text{N}/\text{Ni}$), mentre chiaramente nel BG11 si è misurato solamente il secondo. Si può notare come il consumo del carbonio organico nell'idrolizzato in condizioni di luce alternata sia maggiore rispetto a quello del caso di illuminazione continua: si ipotizza che la microalga sfrutti dunque il carbonio organico durante le ore di buio, ma che, quando possibile, preferisca la via fotosintetica rispetto a quella eterotrofa, come dimostrato dalla ridotta velocità di crescita rispetto al caso di luce continua.

Tabella 4.3 confronto in termini di velocità di crescita e consumo dei nutrienti a condizioni differenti di illuminazione e terreno di coltura.

ore di luce / (d)	Terreno	Velocità di crescita (d^{-1})	$\Delta\text{TN}/\text{TN}_i$	$\Delta\text{P}/\text{P}_i$	$\Delta\text{COD}/\text{COD}_i$	$\Delta\text{N}/\text{Ni}$
24	idrolizzato	1.05	43.26	98	19	39.92
12	idrolizzato	0.347	77	50.73	33.56	52.65
12	BG11	0.357	//	85.82	//	14.19

4.1.2 Crescita in assenza di anidride carbonica

4.1.2.1 Illuminazione continua

Successivamente, si sono condotti in parallelo due esperimenti, nelle stesse condizioni dei precedenti, ma in assenza di anidride carbonica: nel primo si è fatta crescere *Scenedesmus obliquus* su idrolizzato, e nel secondo su BG11, come controllo. Le ulteriori condizioni di lavoro sono specificate in tabella 4.4.

Tabella 4.4 Condizioni di lavoro adottate

Condizioni di lavoro	
CO ₂	no
Illuminazione	120 μmol/(m ² s) (continua)
Volume di reazione	100 ml
Temperatura	23°C
BG11/controllo	N 247 mg/L
	P 5.4 mg/L
Idrolizzato	N 247 mg/L
	P 34 mg/L

Le curve di crescita ottenute con i due diversi terreni sono riportate in figura 4.4. Confrontando queste due curve si vede come la concentrazione cellulare e la velocità di crescita ottenute nell'idrolizzato siano molto superiori rispetto a quelle ottenute in BG11. In tabella 4.5 vengono confrontate le velocità di crescita e i consumi di nutrienti dei due esperimenti in questione.

Tabella 4.5 confronto tra le velocità di crescita e i consumi di nutrienti ottenuti facendo crescere *Scenedesmus obliquus* in BG11 e nell'idrolizzato, in assenza di anidride carbonica.

ore di luce /(d)	Terreno	Velocità di crescita (d ⁻¹)	ΔTN/TNi %	ΔP/Pi %	ΔCOD/CODi %	ΔN/Ni %
24	idrolizzato	0.345	61.55	40.02	44	30.93
24	BG11	0.097	//	18.40	//	27.57

La velocità di crescita su idrolizzato è circa 4 volte quella su BG11, dove la crescita è limitata dall'assenza del carbonio, perché in questo caso l'unica fonte di C è data dalla piccola percentuale di CO₂ atmosferica. Il consumo dei nutrienti nel caso dell'idrolizzato di conseguenza risulta nettamente maggiore rispetto al caso del terreno di controllo. Inoltre, il consumo di COD è anche maggiore di quello risultato in presenza di aria arricchita con anidride carbonica §4.1.1, il che indica che le microalghe, in assenza di CO₂, sono in grado di utilizzare l'unica fonte disponibile di carbonio: il carbonio organico. Tuttavia, come suggerito dalla velocità di crescita, molto inferiore

rispetto al caso in cui viene usata aria arricchita di CO₂, esse sembrano comunque preferire la fonte inorganica quando presente.

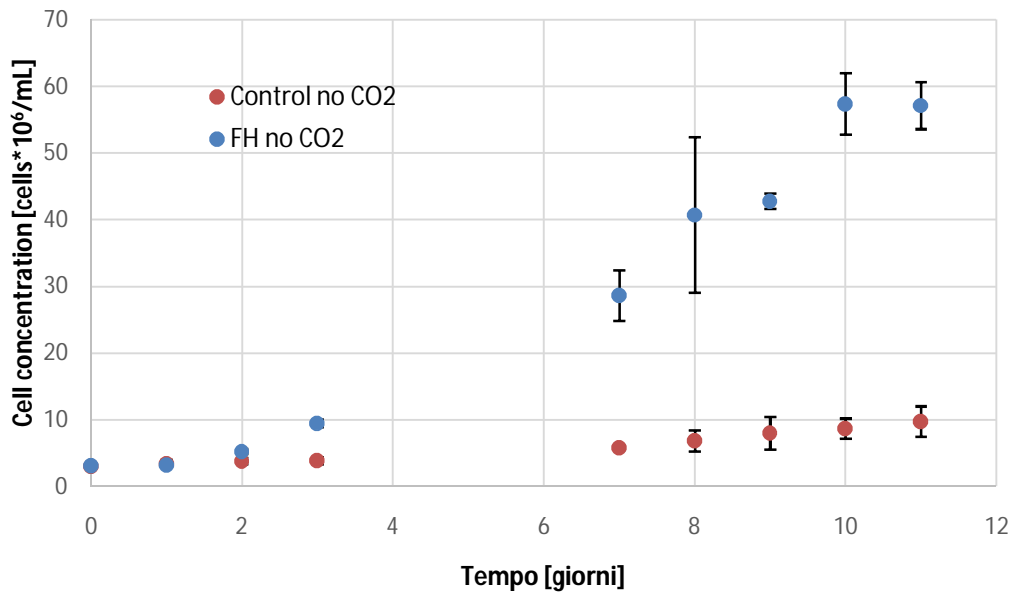


Figura 4.4 confronto tra curve di crescita di *S. obliquus* nell'idrolizzato (FH no CO₂, in blu) e in BG11 (control no CO₂, in rosso), in condizioni di illuminazione continua e assenza di CO₂. "FH no CO₂" (sta per flash hydrolysis in assenza di CO₂), mentre "controllo no CO₂" (sta per il terreno di coltura adottato in assenza di CO₂).

4.1.2.2 Illuminazione alternata (12 ore)

Le ultime condizioni sperimentali investigate sono le medesime del caso precedente (assenza di anidride carbonica), ma questa volta con illuminazione discontinua, similmente a quanto descritto nel §4.1.1.2. Anche in questo caso, parallelamente alla crescita nell'idrolizzato si è misurata quella in BG11, come controllo. In entrambi i casi si sono svolte due repliche biologiche. Le condizioni di lavoro sono sintetizzate in tabella 4.6

Tabella 4.6 Condizioni di lavoro adottate
(12B/12L sta per 12 ore di luce continua e 12 ore di buio)

Condizioni di lavoro	
CO ₂	no
Illuminazione	120 mol/m ² s (12B/12L)
Volume di reazione	100 ml
Temperatura	23°C
BG11/controllo	N 247 mg/L
	P 5.4 mg/L
Idrolizzato	N 247 mg/L
	P 34 mg/L

Le curve relative alla crescita nei due diversi terreni sono riportate in figura 4.5. Dal confronto si ha la conferma che la crescita nell'idrolizzato è molto superiore rispetto a quella in BG11, in termini sia di velocità di crescita sia di concentrazione di cellule finale. Questo sembra confermare che nell'idrolizzato la specie utilizzata sfrutta l'eterotrofia, mentre nel controllo le microalgahe sono limitate sia dalla luce che dal carbonio.

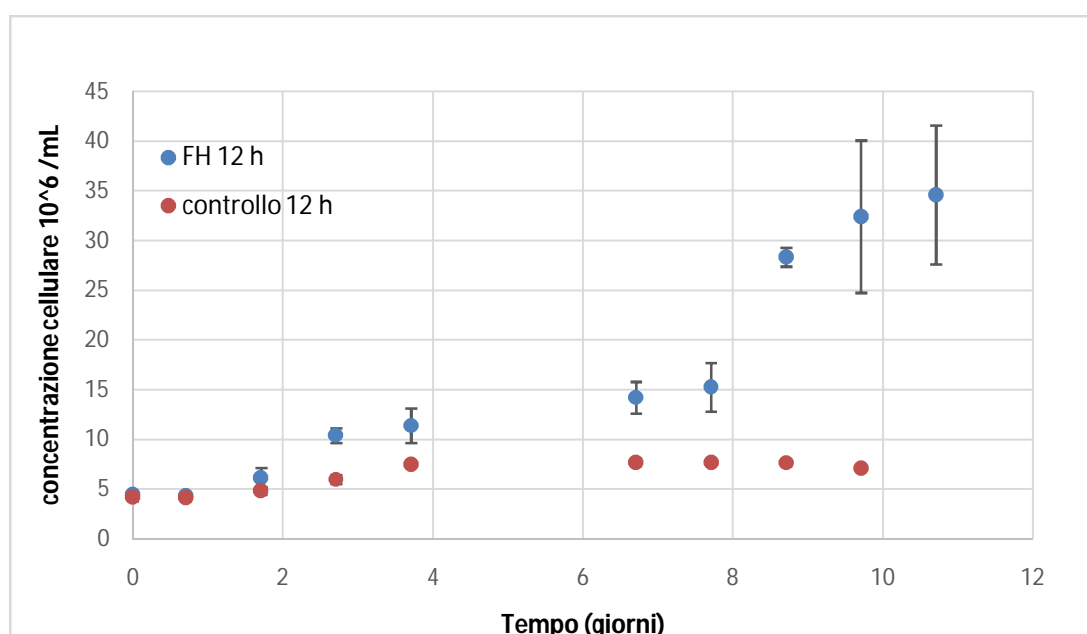


Figura 4.5 confronto tra curve di crescita di *S. obliquus* nell'idrolizzato (FH 12) e in BG11(controllo 12h), in condizioni di illuminazione alternata e assenza di CO₂

In tabella 4.5 vengono confrontate le velocità di crescita e i consumi di nutrienti dei due esperimenti in questione. Si vede come il consumo di COD sia maggiore a tutti i casi precedentemente esaminati: in questo caso il carbonio organico è l'unica fonte disponibile di carbonio, e durante i periodi di buio, è probabilmente consumato in maggiore quantità per far fronte alla carenza di luce.

Tabella 4.5 confronto fra velocità di crescita e consumi di nutrienti nell'idrolizzato e nel controllo (BG11), in condizioni di luce alternata e assenza di CO₂

ore di luce / (d)	Terreno	Velocità di crescita (d ⁻¹)	$\Delta\text{TN}/\text{TN}_i$ %	$\Delta\text{P}/\text{P}_i$ %	$\Delta\text{COD}/\text{COD}_i$ %	$\Delta\text{N}/\text{N}_i$ %
12	idrolizzato	0.34	50.70	40.24	63.97	53.66
12	BG11	0.20	//	23.40	//	25.52

4.2 Esperimenti in continuo

4.2.1 Effetto della concentrazione di idrolizzato in alimentazione

Come situazione di riferimento, dapprima si è fatta crescere *Scenedesmus obliquus* in BG11, modificato in modo che tutti i nutrienti e micronutrienti fossero presenti in quantità non limitanti (in eccesso) per la crescita, in particolare con concentrazione doppia rispetto a quello standard. La concentrazione di azoto, che in questo caso è stato fornito in forma ammoniacale (NH₄Cl) invece che di nitrato (NaNO₃), è dunque di 494 mg/L, mentre il fosforo è presente in forma di fosfato (K₂HPO₄) nella concentrazione di 89 mg/L (largamente in eccesso). Le condizioni di lavoro adottate sono esplicitate in tabella 4.6, e restano le stesse per tutti i successivi esperimenti presentati in questo paragrafo.

Tabella. 4.6 condizioni di lavoro adottate per gli esperimenti in continuo

Condizioni di lavoro	
illuminazione	150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$
temperatura	23°C
CO ₂	5% in volume
capacità del reattore (flat-panel)	128 ml
portata	32 ml/d
tempo di permanenza	4 d

Dopo aver raggiunto lo stato stazionario con il terreno di controllo, si è utilizzato l'idrolizzato come alimentazione al reattore continuo, per verificare se esso sia adatto anche a una produzione microalgale continua. In particolare, si è studiato l'effetto sulla produttività, della concentrazione di azoto e fosforo (e quindi dell'idrolizzato) alimentati, al fine di ottimizzarne il quantitativo fornito. Nella tabella 4.7 sono riassunte le diverse condizioni di alimentazione sperimentate, in termini di concentrazione (mg/L) di azoto e fosforo.

Tabella. 4.7 Concentrazioni di alimentazione sperimentate, in termini di N e P

Esperimento	Concentrazione di azoto mg/L	Concentrazione di fosforo mg/L
Controllo	494	89
N.1 con Idrolizzato	350	68
N.2 con Idrolizzato	350	50
N.3 con Idrolizzato	300	43
N.4 con Idrolizzato	250	36

Poiché l'obiettivo è di fornire il minor quantitativo possibile di nutrienti, tale però da mantenere una certa produttività accettabile, si è dapprima, nel controllo, lavorato con largo eccesso di N e P per quantificare il loro effettivo consumo:

$$\Delta N^c = N_i^c - N_u^c \text{ (equazione 4.1)}$$

dove con N_i^c, N_u^c indicano la concentrazione di azoto (nel terreno di controllo) in ingresso e in uscita rispettivamente. Inoltre

$$\Delta P^c = P_i^c - P_u^c \text{ (equazione 4.2)}$$

dove con P_i^c, P_u^c si indicano la concentrazione di fosforo (nel terreno di controllo) in ingresso e in uscita rispettivamente.

In queste condizioni si è raggiunta una concentrazione di biomassa pari a $3.09 \text{ g/L} \pm 0.141$ (figura 4.8), che corrisponde ad una produttività di 0.772 g/L/d . Il consumo dei nutrienti è riportato in tabella 4.8

Tabella 4.8 consumi di azoto e di fosforo relativi alla crescita microalgale nel terreno di controllo

consumi di azoto e fosforo	
ΔN (mg/L)	350
ΔP (mg/L)	68

Nel successivo esperimento (N.1), in cui è stato utilizzato come terreno l'idrolizzato, si è alimentata una concentrazione di N e P pari a quella consumata nell'esperimento precedente ($N_i^1 = 350 \text{ mg/L}$, $P_i^1 = 68 \text{ mg/L}$). Si precisa che nell'idrolizzato una concentrazione di 350 mg/L di azoto corrisponde a 50 mg/L di fosforo, perciò si è aggiunto dell'ulteriore fosforo in forma di fosfato (K_2HPO_4), in quantità tali da raggiungere il valore desiderato. Come si vede nelle Fig. 4.6, 4.7, 4.8 viene raggiunto uno stato stazionario, dopo circa 5 giorni, e la concentrazione di biomassa (nonché la produttività, poiché τ è tenuto costante) non variano rispetto al controllo ($3.11 \pm 0.155 \text{ g/L}$ e $0,778 \pm 0.039 \text{ g/L/d}$). Tuttavia, in uscita si sono misurate concentrazioni di azoto e fosforo diverse da zero (i consumi sono riportati in tabella 4.9), indice del fatto che si è lavorato senza limitazione di nutrienti.

Tabella 4.9 consumi di azoto e di fosforo relativi alla crescita microalgale nell'idrolizzato a concentrazioni iniziali di azoto e fosforo rispettivamente di 350 e 68 mg/L

consumi di azoto e fosforo	
ΔN (mg/L)	216,79
ΔP (mg/L)	42,31

Nell'esperimento N.2 si è utilizzata la stessa concentrazione di idrolizzato, senza però l'ulteriore aggiunta di fosforo. In questo caso si è osservato un aumento significativo sia nella conta cellulare che nella concentrazione di biomassa (vedi Figura 4.6 e 4.8 rispettivamente). Essa in questo caso è infatti pari a $3,73 \pm 0,105$ g/L (con produttività pari a 0,932 g/L/d). Si ipotizza che l'eccesso di fosforo possa avere un effetto inibitorio sulla crescita cellulare, e che pertanto una sua riduzione rispetto all'azoto presente nel mezzo possa aver condotto all'aumento di produttività. Tale aspetto verrà discusso in seguito.

A questo punto, poiché risultavano ancora nutrienti presenti in uscita al reattore, si è proseguito con gli esperimenti diminuendo la concentrazione di idrolizzato (con rapporto tra contenuto di azoto e fosforo è mantenuto fisso) fino a che non si verificasse una diminuzione della concentrazione e produttività, indice del raggiungimento di concentrazioni limitanti. I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 4.6, 4.7 e 4.8. In particolare, diminuendo la concentrazione di idrolizzato a 300 mg/L di N e 43 mg/L di P (N.3), la concentrazione di biomassa e la produttività non variano significativamente rispetto al caso precedente ($3,56\text{g/L} \pm 0,184$ e $0,89$ g/L/d rispettivamente). Un'ulteriore riduzione della concentrazione (N.4), portava invece ad un calo della produttività, ad indicare che tali condizioni sono limitanti per la crescita.

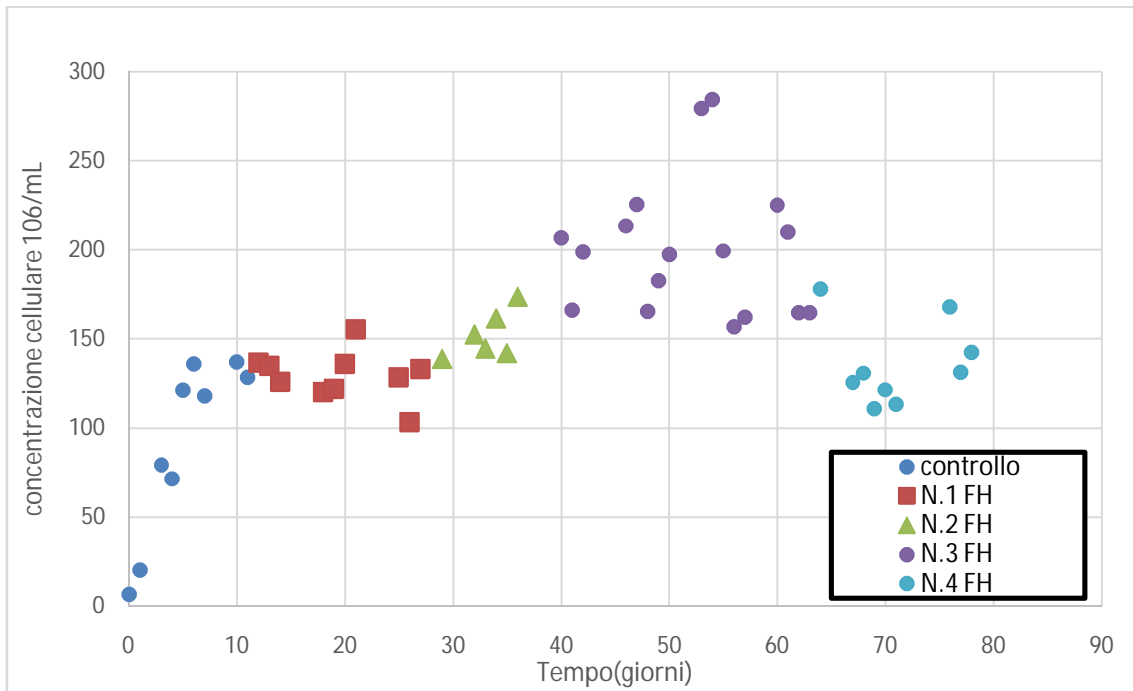


Figura 4.6 concentrazione cellulare in funzione del tempo, per le diverse concentrazioni sperimentate: controllo (blu), N.1 (rosso), N.2 (verde), N.3 (viola) e N.4 (azzurro). FH sta per indicare che la crescita è stata fatta su idrolizzato

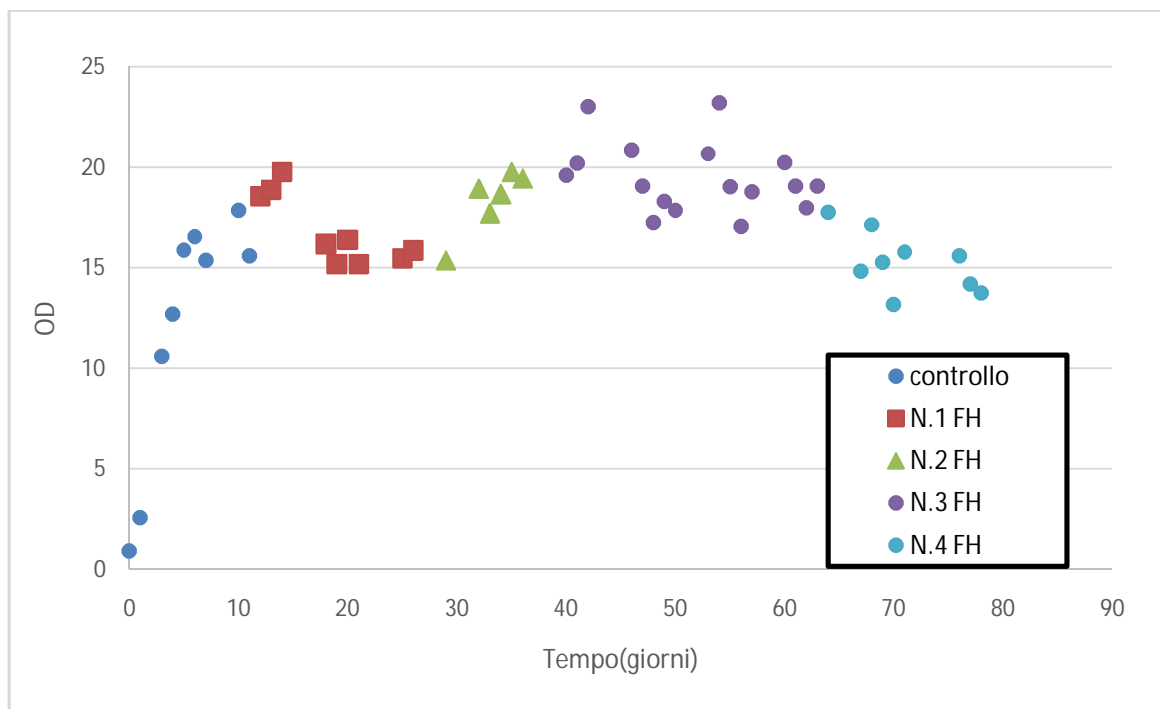


Figura 4.7 Densità ottica misurata ad una lunghezza d'onda di 750, per le diverse concentrazioni sperimentate: controllo (blu), N.1 (rosso), N.2 (verde), N.3 (viola) e N.4 (azzurro). FH sta per indicare che la crescita è stata fatta su idrolizzato

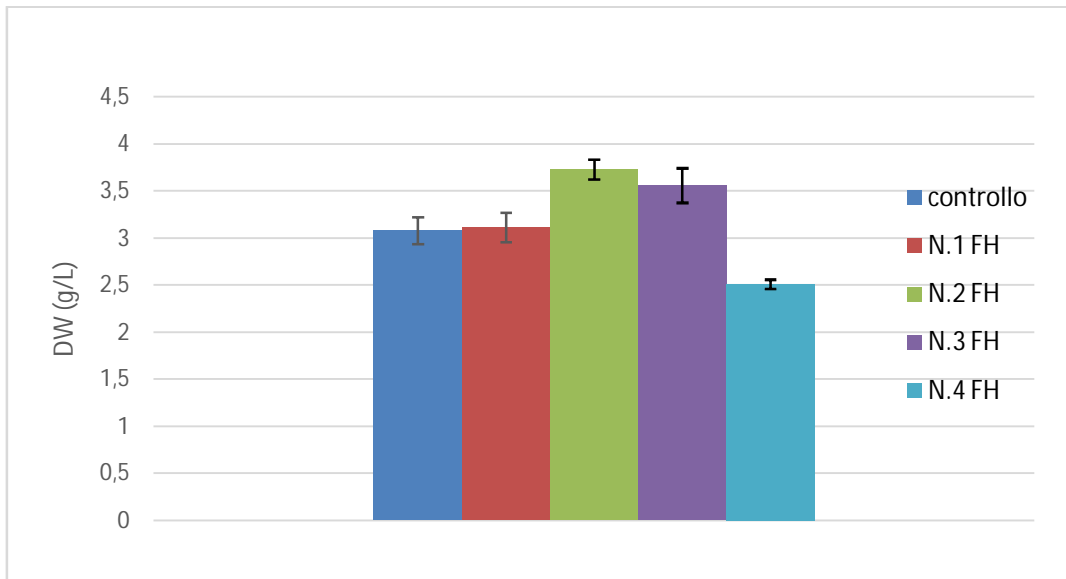


Figura 4.8 Concentrazione di biomassa (peso secco) alle condizioni di stato stazionario, ottenuti in funzione delle diverse condizioni di concentrazioni alimentate.). FH sta per indicare che la crescita è stata fatta su idrolizzato

Per ogni stato stazionario, oltre alle analisi relative all'azoto totale e al fosforo (come fosfato) già descritte, si sono misurati anche l'azoto ammoniacale e il COD, sia sulla corrente d'alimentazione che su quella in uscita. Da tali valori si è calcolata la resa media dei vari nutrienti in rapporto alla concentrazione di biomassa prodotta, per ogni stato stazionario ottenuto. Per la resa di azoto si sono considerate le misure di azoto totale, ed essa è stata calcolata come:

$$Y_{TN/DW} = \left[\frac{TN_i - TN_u}{DW * 1000} \right] * 100, \quad (\text{equazione 4.3})$$

dove con DW si indica il peso secco (in g/L) allo stato stazionario considerato e con TN_i , TN_u le concentrazioni di azoto totale in mg/L in ingresso e in uscita rispettivamente. I valori di resa di azoto sono riassunti in Tabella 4.10 per i vari stati stazionari ottenuti.

Tabella. 4.10 rese di azoto totale in percentuale, e corrispondente concentrazione di biomassa, nel controllo e nelle colture effettuate con l'idrolizzato.

Esperimento	$Y_{TN/DW}$ %	DW g/L	dev.st del DW
Controllo	11	3.08	0.141
N.1 con Idrolizzato	6.96	3.11	0.155
N.2 con Idrolizzato	6.08	3.73	0.105
N.3 con Idrolizzato	5.33	3.56	0.184
N.4 con Idrolizzato	4.84	2.51	0.050

Si osserva un andamento decrescente della resa con il diminuire della concentrazione di azoto alimentato.

L'azoto è stato misurato anche come azoto ammoniacale, per verificarne il contributo al consumo totale (si ricorda che nel controllo l'azoto ammoniacale coincide con quello totale). Nella tabella 4.11 è riportata la percentuale di azoto ammoniacale consumato rispetto al consumo totale.

Tabella 4.11 consumo dell'azoto in forma ammoniacale ($\Delta N(NH_3)$) rispetto a quello totale (ΔTN), nei vari stati stazionari sperimentati

Esperimento	$\Delta N(NH_3)/\Delta TN$ %
Controllo	100
N.1 con Idrolizzato	75.29
N.2 con Idrolizzato	44.75
N.3 con Idrolizzato	92.54
N.4 con Idrolizzato	97.49

Si vede come, in generale, la forma ammoniacale è la fonte di azoto prediletta della microalga considerata, come riportato anche in letteratura (Giorgos Markou 2014), costituendo la percentuale maggiore dell'azoto consumato. In ogni caso, la restante frazione di azoto fornita da composti organici. La resa del fosforo è calcolata in modo del tutto analogo all'equazione 4.3:

$$Y_{P/DW} = \left[\frac{P_i - P_u}{DW * 1000} \right] * 100 \quad (\text{equazione 4.4})$$

dove P_i e P_u sono le concentrazioni (in mg/L) di fosforo (come fosfato) in ingresso in uscita rispettivamente. Per i vari stati stazionari i valori di resa di fosforo ottenuti sono riportati in tabella 4.12

Tabella. 4.12 rese in percentuale di fosforo e corrispondente concentrazione di biomassa, nel controllo e nelle colture effettuate con l'idrolizzato

Esperimento	$Y_{P/DW}$ %	DW g/L	dev.st del DW
Controllo	2.13	3.08	0.141
N.1 con Idrolizzato	1.36	3.11	0.155
N.2 con Idrolizzato	0.776	3.73	0.105
N.3 con Idrolizzato	0.322	3.56	0.184
N.4 con Idrolizzato	0.549	2.51	0.050

Dalla tabella si vede che anche nel caso del fosforo la resa decresce con il diminuire della concentrazione di fosforo nell'alimentazione. A tal proposito, si propongono alcune considerazioni aggiuntive, anche in relazione a quanto osservato in termini di produttività negli esperimenti N.1 e N.2.

Scenedesmus obliquus generalmente contiene una percentuale di fosforo che spazia nell'intervallo 0.35-1 %. Negli esperimenti di controllo e N.1 (quelli con largo eccesso di P in ingresso) i valori di resa trovati (che rappresentano in percentuale quanto della massa microalgale è costituito dal nutriente in questione) risultano molto superiori all'estremo superiore dell'intervallo indicato. In letteratura è riportato che, quando il fosforo viene fornito in largo eccesso, le microalghe possono immagazzinarlo nelle loro cellule senza però utilizzarlo per la loro crescita. Tale fenomeno è conosciuto come *luxury up-take* e costituisce di fatto uno spreco del nutriente, che può essere correlato anche a un'inibizione della crescita. (Bolsunovskii and Kosinenko, 2000; Powell et al., 2009; Shively, 1988). Si ipotizza dunque che si sia manifestato questo fenomeno nel caso del controllo e dell'esperimento N.1,.

Come già anticipato nel paragrafo precedente relativamente agli esperimenti in batch, oltre al carbonio inorganico fornito attraverso l'anidride carbonica, insufflata nel fotobioreattore,

nell'idrolizzato è presente anche carbonio in forma organica. Analogamente nel caso di coltivazione in continuo è stato misurato, per tutti gli stati stazionari ottenuti, un consumo di COD, riportato nella tabella 4.13. Tale consumo è indice di una crescita mixotrofica. Il (ΔCOD) è stato calcolato come:

$$\Delta\text{COD} = \left[\frac{\text{COD}_i - \text{COD}_u}{\text{COD}_i} \right] * 100 \quad (\text{equazione 4.5})$$

Dove COD_i e COD_u sono rispettivamente la concentrazione di COD in ingresso in uscita rispettivamente.

Tabella. 4.13 Consumo percentuale di COD e corrispondente concentrazione di biomassa (DW) nel controllo e nelle colture effettuate con l'idrolizzato.

Esperimento	ΔCOD %	DW g/L
N.1 con Idrolizzato	66.56	3.11
N.2 con Idrolizzato	49.48	3.73
N.3 con Idrolizzato	31.72	3.56
N.4 con Idrolizzato	39.35	2.51

Dalla tabella 4.13 si vede che il consumo di COD diminuisce con il diminuire della concentrazione di idrolizzato in ingresso, in linea con quanto trovato per gli altri nutrienti.

4.2.2 Effetto del tempo di permanenza

Una volta individuata la concentrazione di idrolizzato ottimale per un tempo di residenza $\tau = 4$ d, si è proseguito lo studio sul reattore continuo concentrandosi su come la crescita e la produttività di *Scenedesmus obliquus*, variassero al variare del tempo di permanenza. Si sono studiati tre valori di τ , per ognuno dei quali è stato ottenuto uno stato stazionario diverso. La concentrazione di idrolizzato in alimentazione è la medesima per tutti gli esperimenti, in particolare è pari a quella risultata limitante nel caso precedente (250 mg/L N e 36 mg/L P), per verificare se lo fosse anche a τ diversi. Si è fatta dunque variare la portata, che è stata progressivamente aumentata, sperimentando così tempi di permanenza decrescenti. Le condizioni di lavoro adottate nei tre stati stazionari considerati sono riassunti nella tabella seguente (tabella 4.14).

Tabella. 4.14 Condizioni di lavoro adottate per quanto concerne: illuminazione, temperatura, volume del reattore, e concentrazioni all'alimentazione.

Condizioni di lavoro e τ sperimentati	
illuminazione	150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$
temperatura	23°C
CO ₂ alimentata	5% in volume
capacità del reattore	128 mL
azoto alimentato	250 mg/L
fosforo alimentato	35.6 mg/L
Esperimento: τ_1	4 d
Esperimento: τ_2	2.5 d
Esperimento: τ_3	1.5 d

I risultati, in termini di concentrazione cellulare, densità ottica, e concentrazione di biomassa relativi a tali esperimenti sono sintetizzati nelle figure (Fig. 4.9, 4.10 e 4.11 rispettivamente), in cui i diversi tempi di residenza sono rappresentati con colori diversi, e ciascuno stato stazionario è evidenziato con un segmento orizzontale. Il peso secco e le misure dei nutrienti sono stati valutati dalla media di almeno tre giorni dopo che il sistema aveva raggiunto lo stato stazionario.

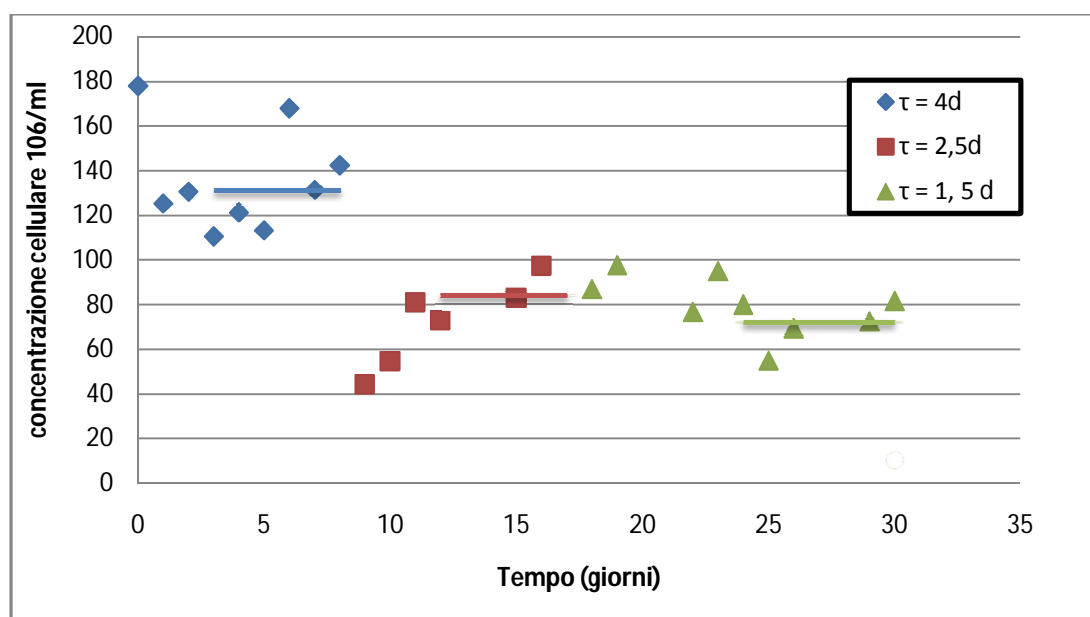


Figura 4.9 Concentrazione cellulare in funzione del tempo, per i diversi tempi di residenza: 4 d (blu), 2.5 d (rosso) e 1.5 d (verde)

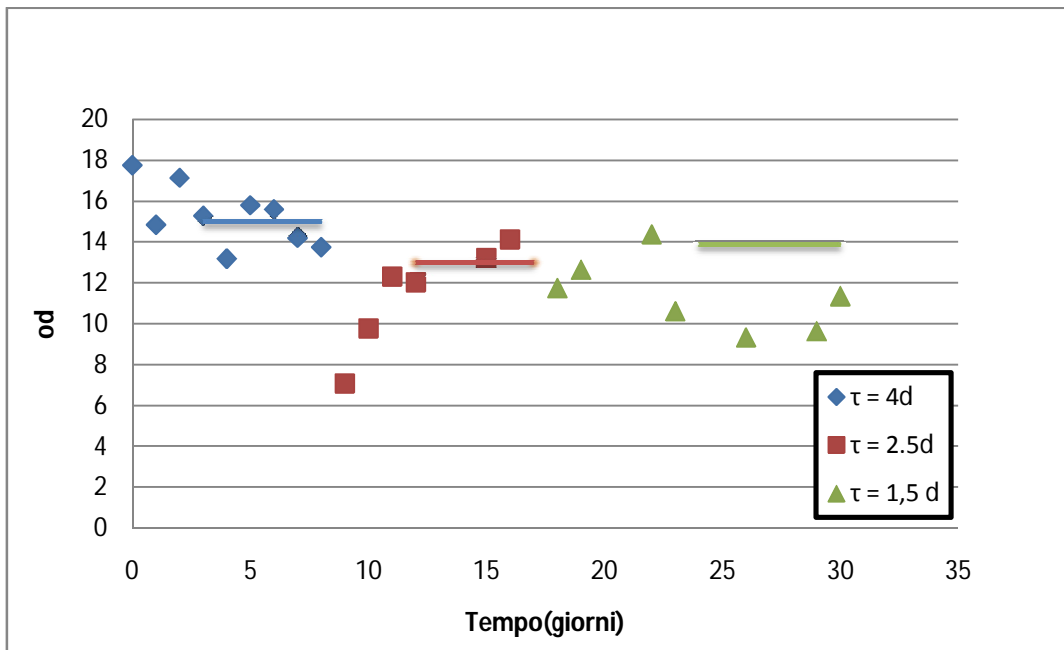


Figura 4.10 densità ottica ad una lunghezza d'onda di 750 nm in funzione del tempo, per i diversi tempi di residenza 4 d (blu), 2.5 d (rosso) e 1.5 d (verde)

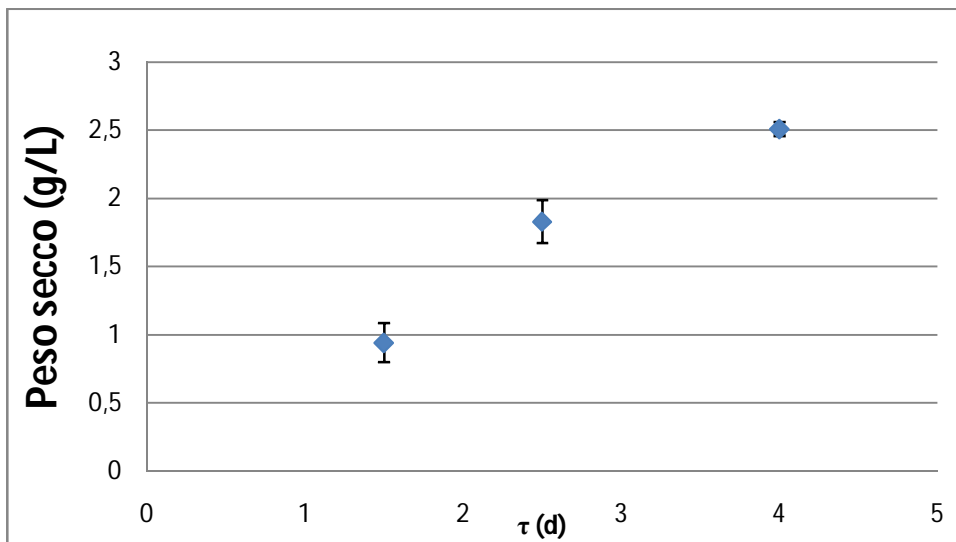


Figura 4.11 peso secco in g/L, per i diversi tempi di permanenza sperimentati

La tendenza che si evince dai valori di peso secco, riportati in figura 4.11, è che la concentrazione di biomassa prodotta, in accordo con svariati lavori di letteratura (Barbera E., Sforza E. e Bertucco A. 2015) diminuisce con il tempo di permanenza ovvero all'aumentare della portata alimentata.

In figura 4.12 viene riportata la produttività in funzione dei tempi di permanenza sperimentati. Per un valore di circa 2.5 d, di tempo di permanenza, si può osservare che essa raggiunge un massimo.

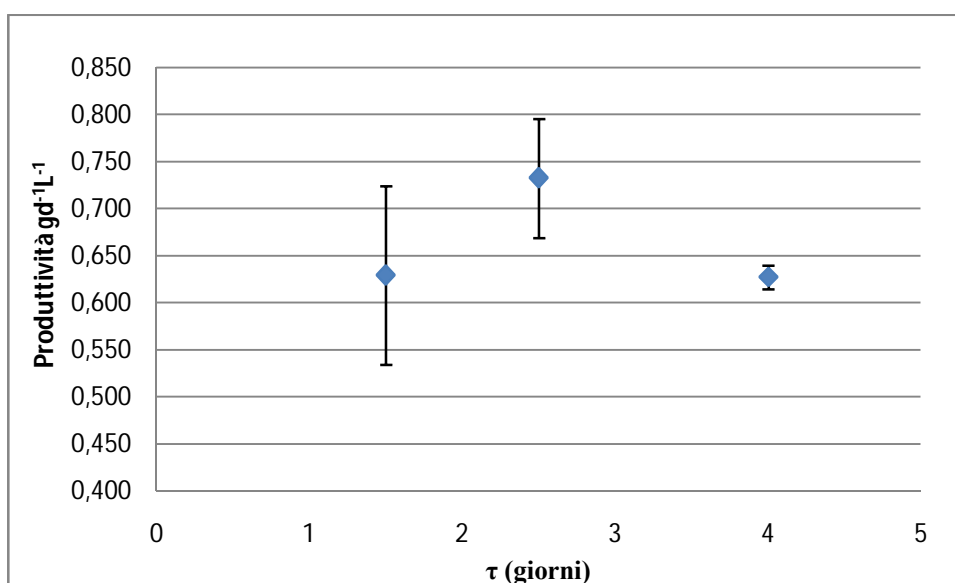


Figura 4.12 produttività in funzione del tempo di permanenza

Per quanto concerne le rese di nutrienti (calcolate secondo le equazioni 4.3 e 4.4), si osserva un aumento al diminuire del tempo di permanenza, sia per l'azoto che per il fosforo, come si può osservare nella tabella 4.15. Ciò è in linea con quanto riportato in altri elaborati (Sforza E, S. Urbani, Bertucco A. 2014), in cui tale andamento è giustificato dalle maggiori richieste energetiche legate all' aumento dell'energia necessaria per il mantenimento cellulare che si verifica al diminuire di τ .

Tabella 4.15 resa percentuale di azoto (TN) e di fosforo ai diversi tempi di permanenza sperimentati, e corrispondente concentrazione di biomassa.

τ (tempo di permanenza)	$Y_{\text{TN/DW}}\%$	$Y_{\text{P/DW}}\%$	DW g/L
4 d	4.84	0.549	2.51
2.5 d	8.16	1.13	1.83
1.5 d	15.27	1.15	0.944

Per *Scenedesmus obliquus* la percentuale di azoto presente tipicamente nella biomassa varia nell'intervallo di 6-8%.

Dai valori riportati in tabella 4.15 si conclude quindi che ad un tempo di permanenza di 4 d l'azoto presente era in concentrazione limitante per la crescita. Per quanto riguarda il fosforo invece si deduce che, esso non era limitante.

Come nei casi precedenti, è stato misurato anche il quantitativo di azoto presente in forma ammoniacale, e i corrispondenti consumi hanno confermato che tale forma risulti essere la fonte preferenziale di N rispetto a quella organica. In tabella 4.15 è riportata la percentuale di consumo di azoto ammoniacale rispetto al consumo totale.

Tabella 4.16 consumo dell'azoto in forma ammoniacale rispetto a quello totale, in percentuale, per i vari stati stazionari sperimentati.

τ (tempo di permanenza)	$\Delta N(NH_3)/\Delta TN$ %
4 d	96.73
2.5 d	68.52
1.5 d	85.14

Per quanto riguarda il consumo percentuale di COD, infine, si riporta la tabella 4.17 per i diversi stati stazionari ottenuti.

Tabella. 4.17 Consumo percentuale di COD per i diversi tempi di permanenza τ

τ	ΔCOD %
4 d	39.35
2.5 d	44.84
1.5 d	49.81

Evidentemente anche il consumo di COD ha lo stesso andamento di quello degli altri nutrienti ed aumenta al diminuire del tempo di permanenza.

L'efficienza energetica (η_{PAR} , *Photosynthetically active radiation*) è stata calcolata per i tre tempi di permanenza sperimentati con la seguente equazione

$$\eta_{PAR} = \frac{Q_0 * DW * LHV}{(0.9 * I_0 - I_u) * A * f} \quad (\text{equazione 4.6})$$

Dove con Q_0 si è indicata la portata volumetrica alimentata, con DW il peso secco finale, con LHV il potere calorifico inferiore della biomassa utilizzata (22 MJ/Kg per *S. obliquus*), I_0 e I_u

rappresentano rispettivamente l'irradianza media incidente e quella uscente dal reattore, A rappresenta la superficie irradiata (99.75 cm^2), ed f è un fattore di conversione (225.3 kJ/mol).

L'andamento di η_{PAR} è stata riportata in figura 4.14, in essa si può notare come per un tempo di permanenza di 2.5 d ci sia un valore massimo di 8.58 %.

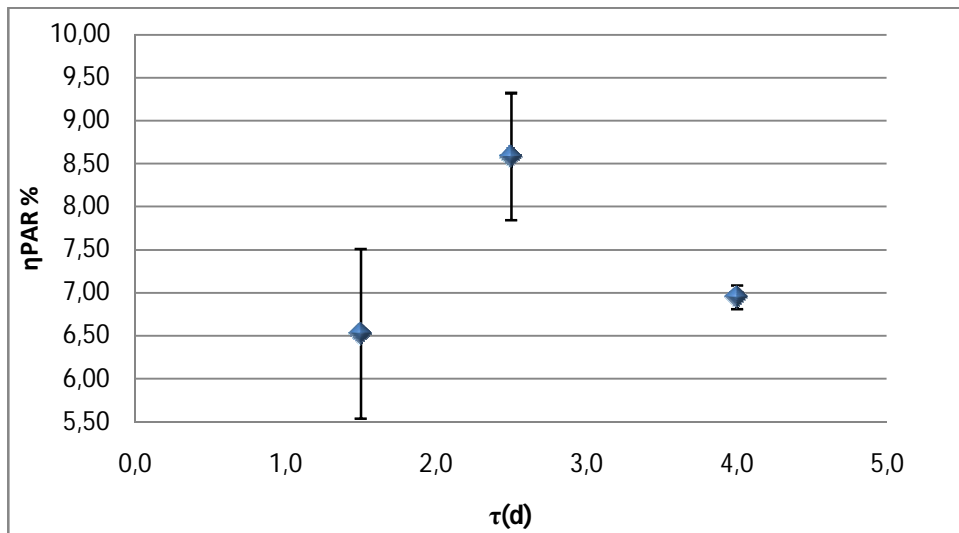


Figura 4.14 η_{PAR} , (Photosynthetically active radiation) in funzione del tempo di permanenza

Per ogni tempo di permanenza si è inoltre calcolato il valore dell'efficienza della conversione (tabella 4.18) della luce indicata con η , riferita al PAR (ossia allo spettro compreso tra 400 e 700 nm), come :

$$\eta \% = 0.43 * \eta_{\text{PAR}} * 100 \quad (\text{equazione 4.7})$$

Tabella 4.18 η in funzione del tempo di permanenza

η %	
4 d	2.987
2.5 d	3.690
1.5 d	2.805

4. 3 Bilanci di materia e di energia

In figura 4.13 viene proposto uno schema a blocchi del processo di produzione di microalghe (*S. obliquus*) integrato ad un'unità di *flash hydrolysis* dalla quale si ricava un'acqua di processo (idrolizzato) ricca di nutrienti, utilizzata per la crescita.

Come base di calcolo si è fissata la produzione di microalghe (1 ton/d, 1g/L) al fine di determinare il make up d'acqua, di azoto e fosforo, mentre si è trascurato invece il contributo dei micronutrienti. L'alga prodotta che contiene il 7,4% di azoto e l'1% di fosforo, la stessa previa una parziale disidratazione (che avviene nel separatore, per decantazione) viene alimentata alla sezione di *flash hydrolysis* ad una concentrazione di 9 g/L (Moscoso 2013). L'ipotesi semplificativa adottata è che la corrente di riciclo della disidratazione contenga tutti i nutrienti in uscita dal reattore ma non la biomassa, la quale va invece ad alimentare la sezione di idrolisi. Quest'ultima è condotta a 280°C, 9s e 20 MPa (Moscoso 2013) e porta alla produzione: di una corrente di idrolizzato, di un prodotto solido (contenente i lipidi) e di una corrente contenete piccole quantità d'acqua, azoto e fosforo.

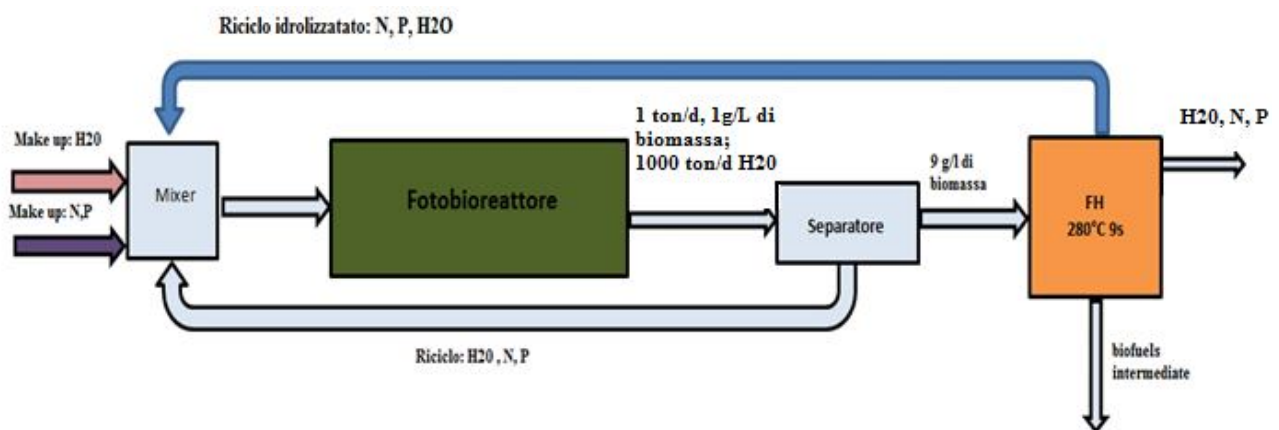


Figura 4.13 schema a blocchi di un processo di produzione di microalghe (*S. obliquus*) con riciclo integrato da flash hydrolysis

Da rapporto di recupero (64,3%) di azoto nell'idrolizzato (Moscoso 2013) si trova la portata di riciclo dell'azoto stesso. Dalla composizione (474 mg/L) e dalla portata dell'azoto nell'idrolizzato si trova invece quanta acqua viene riciclata. Quest'ultima risulta leggermente minore dell'acqua in ingresso alla *flash hydrolysis* in quanto una piccola parte è stata persa come vapore durante il

processo di *flash* e deve dunque essere integrata mediante make up. Dalla percentuale di recupero di *biofel intermediate* (30% rispetto alla portata d'ingresso di solidi) e dalla sua composizione (7.6% per l'azoto, 0.95% per il fosforo) si ricavano le portate di azoto e fosforo in tale corrente. I risultati in termini di portate di make up sono riassunti nella tabella 4.19

Tabella 4.19 Portate di make up di azoto e fosforo e d'acqua

Make up :H2O Kg/d	10727.14
Make up: P Kg/d	3.47
Make up: N Kg/d	26.42

Considerando il valore massimo (3.690) di η di tabella 4.18 si è fatto un dimensionamento di massima del fotobioreattore. In particolare si è calcolato l'area secondo la seguente formula (ottenuta dal bilancio di energia) :

$$A = \frac{LHV * M}{Im * \eta} \quad (\text{Equazione 4.8})$$

Dove con *LHV* si è indicato il potere calorifico inferiore della biomassa utilizzata, con *M* la portata massiva di biomassa alimentata (presa come riferimento: 1 ton/d), *Im* l'irradiazione solare il cui riferimento è di 4500 MJ/m²anno.

E si sono ottenuti così i seguenti valore di area, volume e spessore del reattore riassunti in tabella 4.20.

Tabella 4.20 dimensionamento del fotobioreattore

Area (m2)	48356.61
Volume (m3)	2500
spessore (m)	0.052

Conclusioni

Al fine di rendere la produzione di biocarburanti da microalghe più competitiva si è approfondito lo studio sul riciclo dei nutrienti (N e P), i quali non compongono la frazione lipidica e possono quindi essere recuperati. A tale scopo sono state prese in considerazione le fasi acquose provenienti dalla digestione anaerobica e dalla *flash hydrolysis* della biomassa algale, ed è stata verificata la possibilità di usarle come fonti di nutrienti per la crescita. Le prestazioni ottenute con questi substrati sono state confrontate con quelle relative alla crescita in un terreno standard (BG11).

Per quanto riguarda il digestato, si è constatato che in esso molti dei micronutrienti necessari alla crescita erano presenti in concentrazioni inferiori rispetto al terreno di controllo, se non nulle. Affinché la crescita fosse significativa è stato necessario, in particolare, aggiungere del solfato (MgSO_4), completamente assente nel mezzo, e del fosfato, presente in concentrazioni limitanti. L'aggiunta di altri micronutrienti, sebbene assenti nel digestato, come ad esempio il Fe, non ha comportato alcun miglioramento della crescita. Si è anche sottolineato l'importanza del valore del pH, che deve essere tale da mantenere la concentrazione di NH_3 al di sotto del valore limite di tossicità.

Nel caso dell'idrolizzato ottenuto da *flash hydrolysis*, gli esperimenti in batch hanno mostrato che la specie utilizzata (*S. obliquus*) è in grado di crescere in tale terreno, senza particolari accorgimenti, e in generale meglio rispetto al controllo. Le diverse condizioni sperimentali (presenza o assenza di alimentazione di aria arricchita di CO_2 , ed illuminazione continua o a luce alternata di 12 ore) hanno messo in luce la capacità di tale specie di assimilare l'azoto e il carbonio organici presenti nel mezzo. In particolare, si è notato come in presenza di CO_2 e illuminazione continua la crescita su idrolizzato fosse molto maggiore rispetto al controllo, e si misurasse un consumo di COD, suggerendo una crescita di tipo mixotrofo. Nel caso di illuminazione alternata, tale consumo di COD è risultato superiore rispetto alle condizioni di illuminazione continua, mentre la velocità di crescita è diminuita (sebbene sia stata sempre maggiore rispetto a quella del controllo). Ciò suggerisce che nei periodi di buio le microalghe sfruttano il carbonio organico per la crescita, pur preferendo la via fototrofa. In condizioni di CO_2 limitante *S. obliquus* riesce ancora a sfruttare il carbonio organico per la sua crescita, tuttavia la disponibilità di carbonio inorganico consente una crescita superiore.

Infine è stato verificato che è possibile ottenere una produzione continua di microalghe utilizzando l'idrolizzato come alimentazione, senza doverlo sterilizzare. In particolare, è stata identificata la concentrazione di idrolizzato ottimale per mantenere una produttività assegnata con un tempo di residenza di 4 d. Dal calcolo delle rese di nutrienti su biomassa, le quali decrescono con il diminuire

della concentrazione dei nutrienti alimentati, e dal confronto con la composizione elementare dell'alga, nei casi di largo eccesso di fosforo sono stati osservati fenomeni di *luxury up-take* di questo nutriente, i quali limiterebbero la crescita. In ultimo, si è verificato che, al diminuire del tempo di permanenza la resa di azoto e di fosforo aumenta, mentre la produttività ha dimostrato un valore massimo per un tempo di permanenza pari a 2,5 d. Si sono inoltre verificati i bilanci di materia ed energia.

In futuro si potrebbe cercare un metodo (fisico – chimico) per aumentare la solubilità del fosforo e dei micronutrienti nel digestato, tale da accrescere la loro disponibilità alle microalghe.

Bibliografia

Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan and I. B. Ibraheem. "Microalgae and Wastewater Treatment." *Saudi J Biol Sci* 19, no. 3 (2012): 257-75.

Armandina Ramos Tercero E. (2014) Anaerobic Digestion of Microalgal Residues to Enhance the Energetic Profit of Biocrude Production, AIDIC, DOI: 10.3303/CET1437133

Barbera, Sforza Bertucco, (2015) Maximizing the production of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors under different irradiation regimes: experiments and modeling. *Bioprocess Biosyst Eng*.

Biller P.(2012). Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process. *Algal Research* 1 (2012) 70–76. doi.org/10.1016/j.algal.2012.02.002

Chisti, Y. (2013). Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology*, 167(3), 201–14. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.07.020.

Eleonora Sforza & Silvia Urbani & Alberto Bertucco, Evaluation of maintenance energy requirements in the cultivation of *Scenedesmus obliquus*: effect of light intensity and regime, *J Appl Phycol* (2015) 27:1453–1462, DOI 10.1007/s10811-014-0460-x

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology Advances*

Jakob Breinl (2015) "Hydrothermal Gasification of HTL wastewater"

Khoo, H.H., Sharratt, P.N., Das, P., Balasubramanian, R.K., Naraharisetti, P.K., Shaik, S., 2011. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary

Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012). Microalgae biofuels : A critical review of issues , problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3), 673–690. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.11.008

Liu, X., Clarens, A.F., Colosi, L.M., 2012a. Algae biodiesel has potential despite inconclusive results to date. *Bioresource Technology* 104, 803–806

Moscoso (2012). Flash hydrolysis of microalgae (*Scenedesmus* sp.) for protein extraction and production of biofuels intermediates. *J. of Supercritical Fluids* 82 (2013) 183– 190. doi.org/10.1016/j.supflu.2013.07.012

Maity, Jyoti Prakash, Jochen Bundschuh, Chien-Yen Chen and Prosun Bhattacharya. "Microalgae for Third Generation Biofuel Production, Mitigation Of greenhouse Gas Emissions and Wastewater Treatment: Present And future Perspectives – a Mini Review." *Energy* 78, (2014): 104-113.

Martins, A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications : A review, *14*, 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020

Markou G.(2014) Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *water research* 65 (2 0 1 4) 1 8 6 e2 0 2. doi.org/10.1016/j.waters.2014.07.025

Norsker, N.-H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production—A close look at the economics. *Biotechnology Advances* ..

Robert B. (2013). Levine The Use of Hydrothermal Carbonization to Recycle Nutrients in Algal Biofuel Production. *AIChE*. dOI 10.1002/ep.11812

Uggetti E. (2014) Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology* 152 (2014) 437–443. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.036

Ward A.J. (2014) Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research* 5 (2014) 204–214. doi.org/10.1016/j.algal.2012.02.001

Zhenyi Du (2012). Cultivation of a microalga *Chlorella vulgaris* using recycled aqueous phase nutrients from hydrothermal carbonization process. *Bioresource Technology* 126 (2012) 354–357. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.062.